



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**Estudio del Tratamiento con un Cannabinoide Sintético, WIN  
55, 212-2, en la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental,  
Modelo Animal de Esclerosis Múltiple.  
Análisis del Receptor de Cannabinoides CB<sub>2</sub> en Pacientes**



**ANTONIO J. SÁNCHEZ LÓPEZ**

Madrid, 2007



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA



**Estudio del Tratamiento con un Cannabinoide Sintético, WIN 55, 212-2, en la  
Encefalomielitis Autoinmune Experimental, Modelo Animal de Esclerosis  
Múltiple. Análisis del Receptor de Cannabinoides CB<sub>2</sub> en Pacientes**

Memoria para optar al grado de

**Doctor**

Presentada por

**Antonio J. Sánchez López**

Licenciado en Ciencias Químicas

Director: Dr. Juan Antonio García Merino

Jefe de Sección del Servicio de Neurología

Hospital Universitario Puerta de Hierro

Profesor Asociado de la Facultad de Medicina de la U.A.M.

**A mi familia**

## **AGRADECIMIENTOS**

Cuando echas la mirada atrás, piensas en la cantidad de gente que he conocido y que me ha ayudado a realizar este trabajo. De cada una de estas personas he tomado algo y espero que algo se quede de mí en ellos. Es difícil, pero muy grato, en pocas líneas agradecer a tantas personas lo que ha supuesto para mí su participación directa o indirecta en este trabajo.

En primer lugar, mi agradecimiento al Dr. Antonio García Merino por su gran calidad como persona y como profesional, por darme la oportunidad de realizar este trabajo y mantener la investigación viva en los hospitales.

A todo el grupo de Neuroinmunología, a todos los que pasaron por aquí y a los que continúan dándole a esto de la “neurocosa”: Patri, una de las personas que más me ha enseñado humana y científicamente; Isabel y Carmen, mis grandes predecesoras en esto de la EAE; Puri, la neuróloga más dulce de la CPH; Gelu, un gran compañero y por supuesto tremendo montañero; Charo, muchos años comentando las jugadas; Carmen Martín y Laura, las siempre dispuestas “neuro-mamas”; Elvira, un fuerte apoyo siempre para todo; Paz, una gran amazona viajera.

A las grandes mentes pensadoras y bebedoras esparcidas por medio mundo con las que compartí una época muy entrañable de trabajo y fiesta, a esos cuatro magníficos, Juan, Javi, Víctor y Carlos, muchas gracias. A Clara, Ricardo, Cesar, Linah, Vicent, Ana, Pilar, Mónica, Teresa, por el buen ambiente que hacíais que se respirara allí abajo.....tapando ese olor a formaldehído.

A todo el servicio de Inmunología, en especial a Carlos, Tito, Charo, Javi, David, siempre dispuestos a ayudar. A Natalia con la que he compartido risas, lloros, alegrías, cotilleos y muchos, muchos “pitis”.

A Paloma, mi hematóloga favorita, que siempre dará caña esté donde esté.

A Ángel y Marta y sus “cocoágulos de Moscú”, David, Vanesa, Patricia y Marta futuras promesas de la investigación y grandes comensales. A Luis y Laura, por todos los buenos consejos.

A Mercedes, Jesús y Conchi, por su indispensable ayuda y enseñanzas en el exquisito trato de los animales.

A la gente de la “cueva”, Raquel, María Jesús, Susana, Pablo, Concha, Gloria y toda la gente del Dr. Vargas y de la fundación (para la ley y el orden) LAIR, por su generosidad y paciencia.

A Sara, Pachi, Bea y Natalia, por hacerme siempre muy gratas las visitas al Carlos III.



A Ismael, Manolo, Guillermo y sus “cannabilocos” por aguantar, siempre con buena cara, mis incursiones investigadoras.

Al grupo del Dr. Bonilla, José Miguel, Vanesa, Javier, Cristina..... et al, por la siempre grata colaboración....a distancia.

A todo el servicio de Neurología, Carlos, Antxon, residentes y secretarias por facilitar siempre el trabajo.

A todos los pacientes de esclerosis múltiple por su colaboración.

A José Luis y Martín por cuidar de mis buenas “alimañas” en el animalario.

A María Luisa y Pilar por supervitaminarme y mineralizarme.

Al Dr. Vecino por enseñarme cosas que..... pense que nunca podría ver.

Fuera de este mundo científico he tenido un apoyo igual de importante, sin el que se habría hecho mucho más difícil esta carrera de fondo.

A los Martes, día de dardos con “Cremazo Tin” en el que el esfuerzo físico, la cerveza y mis compañeros Dino, Álvaro, Fernando, Fátima, Ángel, Suela y Ali hacen que todo sea más sencillo.

A todos mis amigos Pavón, Iratxe, Eva, Nacho, Luis, Álvaro, Luiso, María.....y todos los que, cuando lean esta línea sepan que están incluidos aunque no aparezcan, ¡¡¡¡GRACIAS!!!!!! por todo.

A mis padres, porque todo lo que soy y seré se lo debo a ellos.

A mis hermanos, a Mario un tipo de gran corazón y a Isa, un ejemplo de valentía y fortaleza para todos.

A Isabel, la persona que de forma incondicional ha estado a mi lado, apoyándome y animándome siempre con su sonrisa. Muchas de estas horas de trabajo eran tuyas, así que gran parte de esta tesis es también mérito tuyo.

## RESUMEN

Muchos informes han mostrado como los cannabinoides pueden ser beneficiosos en el tratamiento sintomático de la esclerosis múltiple (EM). En este trabajo se ha investigado las propiedades terapéuticas del cannabinoide sintético WIN-2 como un fármaco supresivo de la encefalomiелitis autoinmune experimental, modelo de EM. En la forma pasiva de la EAE, WIN-2 mejora los signos clínicos y disminuye la infiltración celular en la médula espinal. Debida a la implicación de los cannabinoides en la regulación de la muerte y supervivencia celular, se ha investigado el potente efecto proapoptótico de WIN-2 sobre una población de células encefalitógenas y la posible señalización implicada. La asociación de los receptores de cannabinoides se ha investigado con el uso de antagonistas, toxina pertussis y enantiómero inactivo. Estos resultados apuntan a la implicación parcial de CB<sub>2</sub> junto con un mecanismo independiente de receptor o por un receptor aún no caracterizado. También se ha estudiado el efecto de WIN-2 sobre la producción de citocinas y la activación del factor de transcripción NF-κB y de p38 MAPK. Todos estos efectos pueden cooperar en la acción antiinflamatoria de WIN-2 en el modelo de EAE. Por otro lado, el estudio de CB<sub>2</sub> en pacientes de EM ha revelado un aumento de los niveles receptor, lo que indica una cierta implicación del sistema cannabinoide en la enfermedad.

## SUMMARY

Many reports have shown that cannabinoids might be beneficial in the symptomatic treatment of multiple sclerosis (MS). We have investigated the therapeutic properties of the synthetic cannabinoid WIN-2 as a suppressive drug in the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS. In the passive variety of EAE, WIN-2 ameliorates the clinical signs and diminishes the cell infiltration of the spinal cord. Due to the involvement of cannabinoids in the regulation of cell death and survival, we investigated the powerful proapoptotic effects of WIN-2 on the encephalitogenic cell population and the possible signalling pathway implicated. The potential involvement of cannabinoid receptors was investigated in the presence of the antagonists, pertussis toxin and the inactive enantiomer. These results point to the partial involvement of CB<sub>2</sub> receptor together with other receptor-independent mechanism or by yet unknown receptors. We also investigated the effect of WIN-2 on cytokines production, transcription factor NF-κB and p38 MAPK activation. These effects may cooperate in their anti-inflammatory action of WIN-2 in EAE models. On the other hand, the study of CB<sub>2</sub> receptor in patients with multiple sclerosis showed a significant increase in the receptor levels, this result is indicative of the cannabinoid system involvement in the disease.



## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. Esclerosis múltiple (EM)	1
2. Encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)	2
2.1. Tipos de EAE	3
2.2. Validez experimental de los modelos de EM	4
3. Fases de la EAE	5
3.1. Fase de activación de linfocitos T CD4+	5
3.2. Paso de linfocitos T al SNC	6
3.3. Fase efectora	7
3.4. Fase de recuperación	7
4. Cannabinoides	9
4.1. Historia	9
4.2. Sistema cannabinoide	9
4.2.1. Receptores cannabinoides	9
4.2.2. Ligandos cannabinoides	10
4.2.3. Mecanismos de acción	13
5. Cannabinoides y EM	14
6. Cannabinoides y EAE	16
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>III. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>19</b>
1. Animales de experimentación	19
2. Inducción de la EAE	19
3. Evaluación de los signos clínicos	20
4. Cultivo primario de células encefalitógenas reactivas a MBP	20
5. Tratamientos	21
6. Obtención de tejido del SNC	22
7. Estudios histológicos	22
8. Protocolo de activación celular y tinción de citocinas	22
9. Protocolo de tinción para estudiar apoptosis	23
10. DAPI	24
11. Determinación de viabilidad celular por ensayo de MTT	24
12. Western Blot	24
13. Transfecciones y ensayo de actividad luciferasa	26
14. Selección de pacientes y obtención de muestra de sangre	26

15.	Separación de poblaciones linfocitarias .....	26
16.	Extracción de ARN .....	27
17.	Síntesis de ADNc.....	27
18.	Cuantificación a tiempo real (Real Time PCR).....	27
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
1.	Obtención de la EAE aguda monofásica de forma activa y pasiva .....	29
1.1.	Estudio de anatomopatológico de la EAE activa y pasiva .....	30
2.	Estudio de CB <sub>1</sub> en ratas EAE.....	31
3.	Estudio del tratamiento con cannabinoides en la EAE activa y pasiva .....	32
3.1.	Efecto en las manifestaciones clínicas de la EAE activa.....	32
3.2.	Efecto en las manifestaciones clínicas de la EAE pasiva.....	33
3.3.	Estudio anatomopatológico del tratamiento con WIN-2 en la EAE activa y pasiva .....	34
4.	Capacidad encefalitógena del cultivo primario de células mononucleares .....	35
5.	Estudio de la apoptosis inducida por WIN-2 y otros cannabinoides en cultivo primario de células encefalitógenas .....	36
5.1.	Viabilidad por MTT .....	36
5.2.	Efecto del suero .....	37
5.3.	Citometría de flujo y DAPI .....	38
5.4.	Antagonistas SR1 y SR2 .....	40
5.5.	Toxina Pertussis.....	40
5.6.	Expresión de CB <sub>2</sub> .....	41
5.7.	Inducción de apoptosis con otros cannabinoides: endocannabinoides .....	42
5.8.	Receptores de vanilloides.....	42
5.9.	Estudio de proteínas implicadas en la inducción de apoptosis .....	43
5.10.	Inhibidores de caspasas .....	45
5.11.	Inhibidores de calpaínas .....	45
6.	Estudio del efecto de WIN-2 sobre la producción de citocinas pro/antiinflamatorias en cultivo primario de células encefalitógenas .....	46
7.	Estudio del efecto de WIN-2 sobre el factor de transcripción NF-κB .....	47
8.	Estudio del efecto de WIN-2 sobre la vía p38 en cultivo primario de células encefalitógenas .....	50
9.	Estudio de la expresión génica de CB <sub>2</sub> en el sistema inmunológico de enfermos de EM RR .....	53
9.1.	Tasa de expresión génica de CB <sub>2</sub> en células B, NK y T.....	54
9.2.	Diferencias en la tasa de expresión génica de CB <sub>2</sub> en células B, NK y T entre controles y pacientes EM RR.....	55

9.3. Estudio de las modificaciones de la expresión génica de CB <sub>2</sub> en pacientes con EMRR activa a los 6 meses de tratamiento con IFN-β .....	55
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	57
1. Cannabinoides y EM .....	57
2. Cannabinoides y EAE .....	57
3. Expresión del receptor CB <sub>1</sub> en la EAE .....	58
4. WIN-2 en la EAE activa y pasiva .....	59
5. Histología .....	60
6. Apoptosis .....	61
7. Receptores vanilloides .....	62
8. Apoptosis y vías de señalización .....	63
9. p38 MAPK .....	63
10. Citocinas intracelulares .....	65
11. NF-κB .....	66
12. Expresión del receptor CB <sub>2</sub> .....	68
13. Variación del ARNm del receptor CB <sub>2</sub> en células del sistema inmunológico de pacientes de EM .....	68
14. Cannabinoides y neuroprotección .....	69
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	71
<b>VII. REFERENCIAS</b> .....	72
<b>VIII. APÉNDICES</b> .....	86
1. Artículos publicados relacionados con la tesis .....	86
2. Artículos publicados no relacionados con la tesis .....	87

## ABREVIATURAS

<b><math>\Delta^9</math>-THC</b>	$\Delta^9$ -Tetrahidrocannabinol
<b>2-AG</b>	2-Araquidonilglicerol
<b>AEA</b>	Anandamida
<b>AMPC</b>	Adenosin Monofosfato cíclico
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>BHE</b>	Barrera Hematoencefálica
<b>CAM</b>	Cell Adhesion Molecule; Molécula de Adhesión Celular
<b>CFA</b>	Complete Freund's Adjuvant; Adyuvante Completo de Freund
<b>CPZ</b>	Casazepina
<b>CB<sub>1</sub></b>	Cannabinoid Receptor 1; Receptor de Cannabinoides 1
<b>CB<sub>2</sub></b>	Cannabinoid Receptor 2; Receptor de Cannabinoides 2
<b>CBD</b>	Cannabidiol
<b>CPZ</b>	Capsazepina
<b>CREAE</b>	Chronic Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis; EAE Crónica-Recurrente
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified eagle's medium
<b>DMSO</b>	Dimetil Sulfóxido
<b>EAE</b>	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis; Encefalomiелitis Autoimmune Experimental
<b>EM</b>	Esclerosis Múltiple
<b>EM PP</b>	Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva
<b>EM RR</b>	Esclerosis Múltiple Remitente Recurrente
<b>EM SP</b>	Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva
<b>ERK</b>	Extra-Cellular Signal-Regulated Kinase; Quinasa Regulada por Señales Extracelulares
<b>FAAH</b>	Fatty Acid Amide Hydrolase; Amidohidrolasa de Ácido Grasos
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IL</b>	Interleucina
<b>JNK</b>	Jun N-terminal Kinase; Quinasa N-terminal c-Jun
<b>MAG</b>	Myelin-Associated Glycoprotein; Glicoproteína asociada a mielina
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase; Proteína Quinasa Activada por Mitógeno
<b>MBP</b>	Myelin Basic Protein; Proteína Basica de Mielina
<b>MHC</b>	Major Histo-compatibility Complex; Complejo Mayor de Histocompatibilidad
<b>MMP</b>	Matrix Metalloproteinase; Metaloproteinasas de Matriz
<b>MOG</b>	Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein; Glicoproteína mielínica oligodendrocitaria
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor- kappa B; Factor Nuclear de kappa B
<b>NO</b>	Nitric Oxide; Óxido Nítrico
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline; Tampón Fosfato Salino
<b>PLP</b>	Proteolipid Protein; Proteína Proteolípídica

<b>PMA</b>	Phorbol Myristate Acetate; Acetato de Forbol Mirístico
<b>PMSF</b>	Fenilmetilsulfonilfluoride
<b>PTX</b>	Pertussis toxin; Toxina Pertussis
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SNP</b>	Sistema Nervioso Periférico
<b>SR1</b>	SR141716A
<b>SR2</b>	SR144528
<b>TBS</b>	Tris-HCl Buffered Saline; Tampón Salino de Tris-HCl
<b>TCR</b>	T Cell Receptor; Receptor de Célula T
<b>TGF</b>	Transforming Growth Factor; Factor Transformante del Crecimiento
<b>TMEV</b>	Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus; Encefalomyelitis Murina por infección con el Virus de Theiler
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor; Factor de Necrosis Tumoral
<b>VR1</b>	Vanilloid Receptor type 1; Receptor Vanilloide tipo 1
<b>WIN-2</b>	R-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-[(morpholinyl)methyl]pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazinyl]-(1-naphthalenyl)methanone Mesylate; WIN55,212-2
<b>WIN-3</b>	WIN55,212-3



## I. INTRODUCCIÓN

### 1. Esclerosis múltiple (EM)

Las primeras descripciones anatomopatológicas fueron hechas por Cruveilhier (1835) y Carswell (1838), pero es en 1868 cuando Charcot ([Charcot 1875](#)) ofrece la primera descripción detallada de los aspectos clínicos y evolutivos de la enfermedad. La EM es una enfermedad desmielinizante que se caracteriza por la aparición de numerosas lesiones inflamatorias distribuidas a lo largo de la sustancia blanca del sistema nervioso central (SNC), en las que se destruye la vaina de mielina que recubre los axones neuronales. De forma secundaria, las lesiones se reparan mediante cicatrización o gliosis, formándose placas desmielinizadas que alcanzan un tamaño variable (1 mm a 4 cm) ([Lassmann et al. 2007](#)).

Los síntomas son variados según el tipo y estadio de la enfermedad. Los más frecuentes en el inicio son las alteraciones de la sensibilidad (45%), motoras (40%), visuales (20%), disfunción de tronco encefálico (25%), afectación cerebelosa (10-20%), y menos frecuentemente alteración esfinteriana o síntomas de deterioro mental. Durante el curso de la enfermedad se afectan la mayoría de los sistemas funcionales, siendo los más frecuentes las alteraciones sensitivas, motoras y cerebelosas.

La enfermedad tiene dos formas principales de presentación: la recurrente-remitente que supone un 80% de todos los casos y se caracteriza por episodios agudos de disfunción neurológica llamados brotes, y la forma progresiva desde el comienzo, llamada primariamente progresiva y que supone un 15-20% del total. Tras 10 a 15 años de evolución muchos enfermos que comenzaron con brotes experimentan deterioro mantenido de su función neurológica con o sin exacerbaciones sobreañadidas; es lo que se denomina forma secundariamente progresiva. Los signos y síntomas son muy variados, y supone una de las principales causas de invalidez en adultos jóvenes, con una frecuencia doble en mujeres que en hombres, de Europa y Norteamérica.

Si bien la patogenia exacta de la enfermedad no se conoce en detalle, con el transcurso de los años se van asentando algunos aspectos de la misma entre los que destacan: (a) la enfermedad es causada al menos en parte por linfocitos T; (b) puede estar desencadenada por factores medioambientales; (c) existe una base inmunogenética relacionada con múltiples genes, lo que explicaría la mayor prevalencia de la EM entre familiares de pacientes (2-5 % en familiares de primer grado y más de 30 % en gemelos monozigóticos, frente a un riesgo general en la población española de 0,05-0,06 %). La conjunción de estos factores desencadena una alteración en la respuesta inmunitaria que causa la inflamación presente en las lesiones de la EM ([Storch & Lassmann 1997](#)).

Respecto al tratamiento específico de la EM en la última década la introducción de los interferones beta (IFN- $\beta$ ), de los cuales existen dos IFN- $\beta$  1a (Avonex®, Biogen Indec y Rebif®, Merck-Serono) y un IFN- $\beta$  1b (Betaferón®, Bayer-Schering), ha supuesto un cambio radical en esta área ya que han demostrado la capacidad de modificar de forma favorable el curso de la enfermedad. En la actualidad los tratamientos específicos aprobados para la EM, aparte de los ya mencionados interferones, son el acetato de glatirámico, la azatioprina, la mitoxantrona y recientemente el natalizumab.

Los brotes o recaídas se tratan con corticosteroides a altas dosis. Existen también numerosos tratamientos enfocados a controlar los diferentes síntomas de la enfermedad (tratamientos sintomáticos) como el baclofeno para la espasticidad, la isoniazida para la ataxia y el temblor, la amantadina para la fatiga, la carbamazepina para el dolor y otros fenómenos paroxísticos como trastornos de la sensibilidad, visuales, motores y de coordinación. En la actualidad hay en desarrollo una gran cantidad de ensayos clínicos destinados a mejorar el uso de los fármacos existentes y a desarrollar nuevas e innovadoras modalidades de tratamientos (Killestein & Polman 2005).

## 2. Encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)

La hipótesis de que ciertas enfermedades neurológicas tienen una base “autoinmune” fue postulada por Glanzmann en 1927 (Glanzmann 1927), como una explicación de la aparición de las encefalomiелitis que complicaban ciertas infecciones virales como la varicela o la viruela o después de la vacunación antivariólica. Tras la introducción de la vacuna de la rabia por Pasteur en 1876 que se obtenía de virus cultivados en el SNC de conejos, se observó que varios pacientes desarrollaron cuadros paralíticos junto a diversas disfunciones neurológicas tras vacunarse. Remlinger en 1928 (Remlinger 1928) analizó los datos clínicos de más de 1 millón de pacientes tratados con la vacuna de Pasteur y halló más de 500 con complicaciones neurológicas, aproximadamente 1 de cada 1000 casos. Se observó que los cerebros de los pacientes con tales “accidentes neuroparalíticos” eran histológicamente diferentes de aquellos que morían por la rabia. Se pensó entonces que estas complicaciones neurológicas podían estar causadas por materiales distintos de los virus, que se inyectaban junto con la vacuna. Estudios posteriores pusieron de manifiesto que la administración de tejido nervioso sólo o con virus muertos causaba también parálisis en animales, lo cual demostraba que el propio tejido nervioso era capaz de inducir una enfermedad “autoinmune” en el sistema nervioso (Stuart & Krikorian 1928). La hipótesis fue confirmada por Rivers y colaboradores en 1933, al demostrar que la inmunización repetida de animales de experimentación con tejido nervioso mielinizado provocaba de manera regular y reproducible una enfermedad que actualmente conocemos como encefalomiелitis autoinmune (o alérgica) experimental (Rivers et al. 1933).

A principio de los años cincuenta Freund (Freund 1951) desarrolló el adyuvante completo que lleva su nombre (CFA), compuesto por aceite mineral y bacterias (*Mycobacterium tuberculosis*) muertas por calor que al mezclarlo con el antígeno acuoso forma una emulsión que al inyectarla actúa como un depósito que mantiene el efecto del antígeno, acelerando el proceso y aumentando la eficacia de la inducción del modelo propuesto por Rivers.

Posteriormente Einstein y cols (Einstein et al. 1962) demostraron que el agente encefalitógeno era la proteína básica de mielina (MBP), la más abundante de la mielina. En 1960 Paterson (Paterson 1960) descubrió que la EAE podía transferirse mediante la inyección de células linfoides de animales previamente inmunizados, demostrando que la EAE estaba mediada por células. En las últimas décadas se está caracterizando en detalle esta respuesta de células T frente a diferentes epítomos encefalitógenos, así como los mecanismos implicados en la neurodegeneración y la neuroprotección.

## 2.1. Tipos de EAE

La EAE se puede inducir en animales de experimentación de forma activa o pasiva. En la forma activa los animales se inoculan con una emulsión encefalitógena, que consiste en tejido nervioso o componentes purificados de la mielina y CFA. En la forma pasiva a los animales se les inyectan, por vía intravenosa o intraperitoneal, linfocitos T activados procedentes de un animal con EAE, o clones de células T encefalitógenas seleccionadas y cultivadas.

En ambos casos, y para el modelo de rata Lewis, la enfermedad cursa con pérdida de peso, disminución progresiva del tono de la cola, paraparesia e incontinencia, y puede progresar a paraplejía y muerte del animal, si bien al final suele haber una recuperación espontánea de la enfermedad. En la EAE pasiva las manifestaciones clínicas aparecen antes, son menos variables y no se necesita CFA, pero es necesario un cultivo celular y es una técnica más cara y laboriosa comparada con la EAE activa.

Dependiendo de la dosis y ruta de administración del antígeno empleado (tejido completo, MBP, proteína proteolipídica (PLP), glicoproteína asociada a mielina (MAG), glicoproteína mielínica oligodendrocitaria (MOG) o fragmentos purificados de estas proteínas), del animal de experimentación (rata, ratón, cobaya, mono, principalmente), de las distintas cepas empleadas (Lewis, Brown Norway, Dark-Agouti, entre otras), así como de la edad y el sexo, la EAE puede ser aguda (con recuperación espontánea), crónica (si los animales permanecen enfermos sin recuperarse) y si los animales vuelven a enfermar tras recuperarse se denomina crónica-recurrente (Chronic Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis; CREAE). Además, y en relación con estos mismos factores, la EAE puede cursar con desmielinización más o menos acusada, o sin ella. Otro modelo de EM es la encefalomyelitis murina por infección con el virus de Theiler (Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus; TMEV). La inoculación intracraneal del virus de Theiler induce una encefalopatía aguda

seguida de infección persistente del SNC que da lugar a una inflamación crónica desmielinizante que se considera como modelo de EM progresiva.

## 2.2. Validez experimental de los modelos de EM

Desde de la década de los ochenta, la EAE se convirtió en el modelo de enfermedad autoinmune mediada por linfocitos T cooperadoras tipo 1 (Th1). Los diferentes modelos generados en cepas diversas de rata y ratón han ayudado a estudiar una gran cantidad de anomalías inmunológicas que ocurren en la EM, pero dado el número de variables patológicas que muestra la EM, ningún único modelo animal recapitula exactamente las características clínicas y patológicas de la EM.

La EM y la EAE comparten muchos rasgos patológicos e inmunes, como la autorreactividad de linfocitos CD4+Th1 dirigidos contra las proteínas de la membrana mielínica del SNC ([Martin et al. 1992](#)), el patrón de tráfico de linfocitos a través de la barrera hematoencefálica (BHE) al SNC ([Raine 1994](#)), la infiltración linfocitaria y el daño axonal en el caso de determinados modelos.

Otros autores, sin embargo, proponen que aunque la EAE es un buen modelo para el estudio de la desmielinización aguda del SNC en humanos, como es la encefalomielitis aguda diseminada (EAD), pero que su contribución al estudio de la EM es limitada ([Sriram & Steiner 2005](#)). Entre los rasgos patológicos de la EM para los cuales no hay modelo experimental se encuentran los siguientes: la destrucción selectiva de la mielina en ausencia de inmunoglobulinas y complemento, observada en un subgrupo de pacientes con EM y que se piensa estaría mediada por células T y macrófagos; y la destrucción completa de los progenitores de oligodendrocitos que presenta otro subgrupo de pacientes de EM y que impide la remielinización de los axones neuronales ([Archelos et al. 1998](#)).

La mayoría de los tratamientos actualmente en ensayos de fases II y III fueron analizados previamente en la EAE. Entre las terapias para la EM, que se han desarrollado por su eficacia al modular la EAE, está el acetato de glatirámico (Copaxone®) ([Teitelbaum et al. 2004](#)) y el natalizumab (Tysabri®) ([Yednock et al. 1992](#)).

Aunque hay muchos tratamientos que funcionaron en la EAE y fracasaron en la EM, este modelo ha mejorado la comprensión de la inflamación aguda, de la susceptibilidad genética a la autoinmunidad y ha ayudado a descubrir los mecanismos del tráfico de linfocitos y el papel de la BHE en la inflamación del SNC. El estudio de la EAE no sólo ayuda al entendimiento de la EM, sino de enfermedades autoinmunes en general.

### 3. Fases de la EAE

En esquema, la secuencia de acontecimientos que caracterizan la EAE y que se esquematizan en la **figura 1**, comprende:

- activación periférica de células T con especificidad frente a epítomos concretos de neuroantígenos y recirculación.
- entrada en el SNC.
- presentación de antígeno por células residentes y liberación de mediadores: citocinas, quimiocinas, expresión de antígenos de clase II, expresión de moléculas de adhesión y disrupción de la BHE.
- entrada masiva de leucocitos fundamentalmente monocitos/macrófagos y linfocitos T y B.
- aumento de liberación de citocinas mielinotóxicas, factores plasmáticos y anticuerpos.
- liberación de citocinas antiinflamatorias, presencia de células reguladoras, apoptosis y cese del proceso.

#### 3.1. Fase de activación de linfocitos T CD4+

El repertorio inmune normal contiene células T potencialmente autoagresivas como componentes normales. Las células T autorreactivas en la EAE pertenecen al subtipo T CD4+, y en el caso de las reactivas a MBP, reconocen la secuencia peptídica inmunodominante de la MBP p68-84 en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (Major Histo-compatibility Complex; MHC) de clase II, y usan un gen particular, el V $\beta$  8.2, para su receptor de célula T. Sólo tras una activación brusca, las células T autorreactivas se tornan autoagresivas. Las teorías que explicarían la activación de las células autorreactivas en la enfermedad humana son:

Mimetismo molecular: es un fenómeno de reactividad cruzada en el cual el huésped genera una respuesta inmunológica a un factor estimulante, particularmente agentes infecciosos que comparten epítomos con el tejido afectado del huésped. Clones de células T específicos frente a un complejo MHC-autoantígeno se activan de forma errónea por péptidos provenientes del microorganismo. Fujinami y Oldstone ([Fujinami & Oldstone 1985](#)) inducen EAE con un péptido del virus de la hepatitis B, que comparte una secuencia contigua de 6 aminoácidos con la MBP.

Activación por superantígeno: los superantígenos son proteínas bacterianas y virales con capacidad de estimular gran número de células T; se conjugan con MHC de clase II de la célula presentadora de antígeno de manera diferente a los antígenos comunes, uniéndose a la

subfamilia del V beta del TCR del linfocito T. Esta activación no es antígeno específica y actúa sobre gran variedad de clones de células T. Se ha demostrado que la exposición a superantígenos puede alterar el curso de la EAE. La enterotoxina estafilocócica B, disminuía la EAE en ratas Lewis ([Ben Nun 1991](#); [Rott et al. 1992](#)) pero depende de la dosis y del momento de la administración.

Entornos inflamatorios: hay modelos de infecciones crónicas por virus que parecen implicar el reclutamiento y la activación de células T encefalitógenas en ausencia de mimetismo molecular o respuesta a superantígenos. Infecciones con Coronavirus JHM llevan a una encefalomiелitis desmielinizante, y linfocitos de estas ratas reestimulados con MBP y transferidos de forma pasiva provocan lesiones parecidas a las que se dan en la EAE ([Watanabe et al. 1983](#)).

### 3.2. Paso de linfocitos T al SNC

El SNC está protegido del cambiante entorno del torrente sanguíneo por la BHE. En ambos tipos de EAE, activa y pasiva, la activación de las células T CD4+ autorreactivas tiene lugar fuera del SNC. La inyección intravenosa de células encefalitógenas marcadas radioactivamente demostró su migración a través de la BHE en animales sanos ([Hickey 1991](#)). En este modelo es el alto estado de activación, más que la especificidad neuroantigénica de los linfoblastos CD4+, lo que se requiere para que estas células crucen la BHE ([Wekerle 1993](#)).

Sólo si las células reconocen antígeno, permanecen en el órgano diana y desencadenan el proceso inflamatorio. Dos o tres días después, y coincidiendo con el inicio de los síntomas neurológicos, una segunda oleada de células inflamatorias entra en el SNC. Esta segunda oleada también está dominada por células específicas de la población inicial, pero gradualmente son reemplazadas por células derivadas de los linfocitos T del huésped ([Bauer et al. 1998](#)). Además de linfocitos T, también penetran macrófagos que tienen gran importancia en la formación de las lesiones en el SNC.

El mecanismo de migración transendotelial es un proceso de varios pasos que tienen lugar de forma secuencial: en el primer paso, se expresan moléculas de adhesión celular (Cell Adhesion Molecules; CAMs) (superfamilia de las inmunoglobulinas, selectinas, integrinas y cadherinas) en los leucocitos y el endotelio vascular ([Steffen et al. 1994](#)), facilitando un enlentecimiento y adhesión de los leucocitos circulantes a lo largo de la pared del vaso; en un segundo paso, un gradiente de quimiocinas, citocinas quimiotácticas ([Alt et al. 2002](#)), dentro del parénquima dirige la infiltración leucocitaria; finalmente, en un tercer paso, los leucocitos secretan proteasas ([Rosenberg 2002](#)) como las metaloproteinasas de matriz (MMP) que disgregan la BHE, facilitando así la migración dentro del parénquima cerebral.

### 3.3. Fase efectora

Una vez dentro del parénquima del SNC, las células T encefalitogénicas comienzan a interactuar con las células de la glía local, probablemente por medio de la secreción de citocinas proinflamatorias como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor alpha; TNF- $\alpha$ ), que inducen en las células gliales, especialmente en las células de la microglía y en los astrocitos, la expresión de antígenos MHC (McCombe et al. 1994), de moléculas de adhesión (Matsuda et al. 1994), de moléculas coestimuladoras (Gerritse et al. 1996) y otras estructuras que presentan los auto-antígenos a las células inmunes.

La cascada inflamatoria produce una serie de sustancias nocivas, radicales libres de oxígeno y nitrógeno, proteasas y moléculas de complemento, las cuales en combinación con autoanticuerpos, quimiocinas y citocinas inflamatorias, particularmente TNF- $\alpha$  causan el daño celular de oligodendrocitos y la desmielinización.

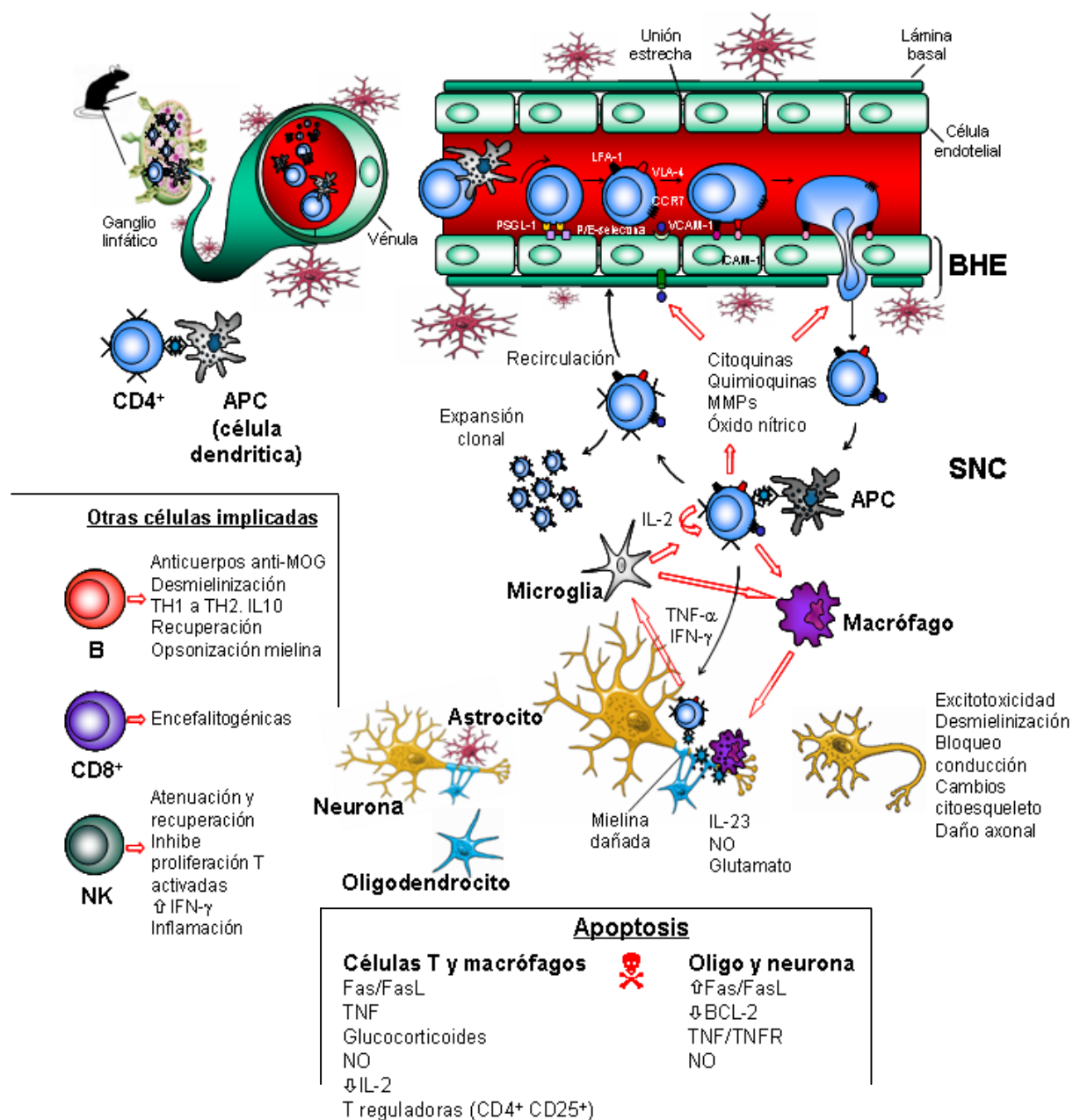
### 3.4. Fase de recuperación

Las formas agudas de EAE son generalmente monofásicas y los animales se recuperan a los pocos días de iniciarse los síntomas neurológicos. La recuperación se asocia a cambios inmunológicos tanto sistémicos como locales. La desaparición de los signos clínicos también se asocia a cambios en el patrón de citocinas tanto circulantes como en las lesiones de EAE. Entre las citocinas relacionadas con la recuperación de la EAE, las mejor estudiadas son la interleucina-10 (IL-10) y el factor transformante del crecimiento-beta (Transforming Growth Factor; TGF- $\beta$ ) (McGeachy & Anderton 2005).

La última fase del tráfico de células T, se caracteriza por la muerte celular extensa. Muchos infiltrados celulares sufren apoptosis como resultado de la interacción con células cerebrales locales (Pender et al. 1992). Esto ha sido demostrado con detalle para los linfocitos T antígeno específicos, pero parece ser cierto también para los monocitos/macrófagos (Bauer et al. 1995). La apoptosis afecta preferentemente a las células infiltradas en el parénquima del SNC. En lugar de emigrar del sistema nervioso central a la periferia, las células inflamatorias que lo infiltran parecen ser eliminadas por la muerte celular programada. Como resultado, los infiltrados inflamatorios desaparecen del SNC durante la recuperación espontánea del ataque encefalitogénico autoinmune.

Más de un 50% de los linfocitos T infiltrados pueden ser destruidos sincrónicamente mediante este mecanismo (Schmied et al. 1993). En experimentos de transferencia pasiva de la EAE se ha podido observar que las primeras células en desaparecer pertenecen a la población de células T autorreactivas transferida originariamente. Posteriormente los mecanismos de apoptosis afectarían a las células no específicas infiltradas en la segunda oleada de inflamación (Bauer et al. 1998).





**Figura .1** Esquema del mecanismo celular en la inflamación y desmielinización que acontece en la EAE. Activación periférica de células T en ganglios linfáticos, entrada al SNC atravesando la BHE por la interacción con moléculas de adhesión, presentación de antígeno por células residentes y liberación de mediadores inflamatorios, aumento de citocinas inflamatorias, activación del endotelio, producción de sustancias tóxicas. Desmielinización, fagocitosis y liberación de citocinas antiinflamatorias, presencia de células reguladoras, apoptosis y cese del proceso.



## 4. Cannabinoides

### 4.1. Historia

La planta del cáñamo, *Cannabis sativa*, es una herbácea, dioica (tiene flores masculinas y femeninas en pies separados) de cosecha anual, perteneciente a la familia de las urticáceas originarias de Asia central.

La referencia más temprana de las propiedades medicinales del cannabis data del 2700 a. C, cuando en China se empleaba para el tratamiento del estreñimiento, la malaria, los dolores reumáticos y los trastornos menstruales. Después se ha empleado a lo largo de la historia en la India, Oriente Medio, Sudáfrica y Sudamérica. Los cannabinoides son un grupo de compuestos psicoactivos presentes en la resina de las hojas y los brotes de la planta de marihuana o *Cannabis sativa*. Esta resina contiene más de 400 compuestos químicos de los cuales alrededor de 60 son los componentes psicoactivos llamados cannabinoides, siendo el principal el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) (Mechoulam & Gaoni 1967).

### 4.2. Sistema cannabinoide

Los diferentes cannabinoides, sean naturales (derivados de la planta), sintéticos (producidos en laboratorio) o endógenos (endocannabinoides) y los receptores a través de los cuales median parte de sus acciones biológicas, se engloban en lo que se conoce como el sistema cannabinoide.

#### 4.2.1. Receptores cannabinoides

Hasta la fecha se han caracterizado dos tipos: los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, ambos pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, caracterizados por tener siete dominios transmembrana.

El **receptor CB<sub>1</sub>** (Devane et al. 1988), es un polipéptido de 476 aminoácidos altamente conservado (97-99%) entre las especies que se ha clonado (humano, rata y ratón), se expresa preferentemente en el SNC. Ha sido localizado en hipocampo, corteza, ganglios basales y cerebelo a muy altas concentraciones. En menor concentración, se encuentra en hipotálamo y médula espinal. También se expresa en sistema nervioso periférico, testículos, sistema inmune, glándula adrenal, médula ósea, corazón, vasos sanguíneos, pulmón, próstata, timo, amígdalas y bazo (Galieue et al. 1995; Howlett et al. 2002). Se han descrito dos variantes de CB<sub>1</sub>, denominadas CB<sub>1(a)</sub> y CB<sub>1(b)</sub>, resultado de “splicing” alternativos (Shire et al. 1995; Ryberg et al. 2005).

Su abundancia en los ganglios basales, cerebelo e hipocampo, se relaciona con los efectos de los cannabinoides sobre la actividad motora y la memoria.

El **receptor CB<sub>2</sub>** (Munro et al. 1993), es un polipéptido de 360 aminoácidos que exhibe una homología global del 44% (68% en las regiones transmembrana) con los receptores CB<sub>1</sub>. Ha sido localizado en bazo, timo, amígdalas, medula ósea, páncreas y corazón, en células mieloides, macrófagos, monocitos de bazo y en una gran variedad de tipos de células inmunes (Pertwee 1997; Pertwee 1998; Howlett et al. 2002). Los mayores niveles de ARNm en células de sangre periférica se encuentran en linfocitos B seguidos de las células citotóxicas naturales (natural killer; NK), monocitos/macrófagos, neutrófilos, linfocitos T CD8+ y linfocitos T CD4+ en orden decreciente (Bouaboula et al. 1993). También ha sido propuesta su presencia y modulación en la microglía (Maresz et al. 2005). Algunos autores han descrito su presencia en neuronas (Onaivi et al. 2006) en diferentes zonas del cerebro (Gong et al. 2006) e incluso su expresión en células madre/progenitoras neurales (Molina-Holgado et al. 2007). Este receptor podría participar en el mecanismo por el que los cannabinoides interaccionan con el sistema inmune, produciendo un efecto globalmente inmunosupresor.

Los cannabinoides pueden también modular la actividad de otros tipos de receptores como los receptores opiodes (Pugh, Jr. et al. 1996), los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (Hampson et al. 1998), los de serotonina (5-HT)<sub>3</sub> (Barann et al. 2002) y los receptores vanilloides tipo 1 (Transient Receptor Potential Vanilloid Receptor 1; TRPV1; VR1) (Dannert et al. 2006). El receptor vanilloide **VR1** (Szallasi & Blumberg 1999) es un canal catiónico no selectivo, que genera un incremento sostenido en la entrada del ión calcio (Ca<sup>2+</sup>) y sodio (Na<sup>+</sup>) a nivel intracelular. El VR1 posee una estructura tridimensional donde se observan seis segmentos transmembrana completos y otro parcial, que es el que se supone está asociado a un canal de Ca<sup>2+</sup>. Otros autores describen efectos cannabinoides a través de membrana (Sarker & Maruyama 2003), de un receptor aún no identificado (Begg et al. 2005) o de un nuevo receptor cannabinoide (Baker et al. 2006).

#### 4.2.2. Ligandos cannabinoides

##### Agonistas

Los ligandos de los receptores de cannabinoides se pueden clasificar en tres grupos según su origen

- Cannabinoides naturales, son los derivados de la planta *Cannabis sativa*, generalmente tienen una estructura carboxílica con veintiún carbonos y están formados por tres anillos, ciclohexano, tetrahidropirano y benceno. Hay aproximadamente 60 cannabinoides en la planta, los principales son el Δ<sup>9</sup>-THC, Δ<sup>8</sup>-tetrahidrocannabinol, cannabidiol (CBD), cannabinol, cannabicromeno, cannabiciolol, cannabigerol y cannabinodiol, que aparecen en cantidades diferentes según la variedad de la planta. También se comercializa Cannador®

(Institute for Clinical Research, IKF, Berlin, Alemania) como un extracto de la planta y Sativex® (GW Pharmaceuticals, Reino Unido) un spray sublingual que contiene  $\Delta^9$ -THC y CBD.

- Cannabinoides endógenos o endocannabinoides, son compuestos que tienen propiedades similares a los encontrados en la planta, pero tiene una estructura química diferente ya que son derivados de ácidos grasos poliinsaturados. Los más representativos son la etanolamida del ácido araquidónico, conocida como anandamida (AEA) (Devane et al. 1992) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Sugiura et al. 1995). Otros como la palmitoilanandamida, oleilamida y oleiletanolamida no son considerados endocannabinoides propiamente dichos ya que no se unen a los receptores CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub>. Los endocannabinoides, como los neurotransmisores clásicos, son liberados por las neuronas tras la despolarización de la membrana y el flujo de calcio al interior de las células, son capaces de unirse y activar receptores de membrana y finalmente se inactivan por un mecanismo de recaptación y degradación.
- Cannabinoides sintéticos, son el resultado del conocimiento de las relaciones existentes entre la estructura y la actividad de los cannabinoides, el cual ha permitido el desarrollo de compuestos sintéticos con actividad cannabimimética más selectivos, estables y eficaces que sus análogos naturales o endógenos. Hay dos cannabinoides sintéticos comercializados para ciertas indicaciones en diferentes pacientes, el nabilone (Cesamet®, Valeant Canada limitee/Limited) que es un análogo del  $\Delta^9$ -THC y el dronabinol (Marinol®, Solvay Pharma Inc, Canada) que es un  $\Delta^9$ -THC sintético.

Estos cannabinoides se pueden clasificar en cuatro grupos en función de su estructura química

- Cannabinoides clásicos, se incluyen compuestos con estructura de dibenzopirano, como son los derivados de la planta y los análogos sintéticos del  $\Delta^9$ -THC, como el 11-OH-8-THC-dimetilheptilo (HU-210) y el 11-OH-hexahidrocannabinol-dimetilheptilo (HU-243). Otros con mayor afinidad por CB<sub>2</sub> son el 1-deoxi-11-hidroxi- $\Delta^8$ -THC-dimetilheptilo, y el JWH-133 entre otros.
- Cannabinoides no clásicos, son análogos bicíclicos y tricíclicos del  $\Delta^9$ -THC que carecen del anillo pirano. El CP55,940 se utilizó para demostrar la presencia de receptores específicos para cannabinoides el cerebro de rata (Devane et al. 1988). Otros representantes de este grupo son el CP55,244, CP50,556 (levonantradol) y el desacetilevantradol.
- Aminoalquilindoles, son moléculas cuya estructura química deriva de la pravadolina, el más estudiado es el WIN-2 (Pacheco et al. 1991). Este compuesto presenta buena afinidad por ambos tipos de receptores de cannabinoides y tiene una selectividad 7 veces mayor por el receptor CB<sub>2</sub> (K<sub>i</sub> de 1.89 para CB<sub>1</sub> y de 0.28 para CB<sub>2</sub>). *In vivo* abarca todos los aspectos farmacológicos que cubre el  $\Delta^9$ -THC. El uso del enantiómero inactivo WIN-3 y de la forma

tritiada de WIN-2 han aumentado el conocimiento de la caracterización y funcionamiento de los receptores de cannabinoides (Kuster et al. 1993). A partir de WIN-2 se han desarrollado nuevos compuestos, con mayor afinidad por este receptor, como el JWH-015 y el L-768242.

- Eicosanoides, se incluyen en este grupo los compuestos con una estructura derivada del ácido araquidónico. Sus principales representantes son la AEA y el 2-AG. La modificación estructural de estos compuestos ha generado agonistas selectivos de CB<sub>1</sub>: la R-(+)-metanandamida (Khanolkar et al. 1996), la araquidonil-2'-cloroetilamida (ACEA), la araquidonilciclopropilamida (ACPA) (Hillard et al. 1999) y el O-1812 (Di Marzo et al. 2001). Otros compuestos de este grupo son la homo- $\gamma$ -linoleniletanolamida, docosatetraeniletanolamida y el reciente 2-araquidonilgliceril éter o noladín éter.

### Antagonistas

Son moléculas capaces de antagonizar de forma selectiva los efectos de los cannabinoides mediados por CB<sub>1</sub> o CB<sub>2</sub>.

- Diaripirazoles, los más estudiados de esta serie son el SR141716A (SR1), potente antagonista del receptor CB<sub>1</sub> (Rinaldi-Carmona et al. 1994) y SR144528 (SR2), potente antagonista del receptor CB<sub>2</sub> (Rinaldi-Carmona et al. 1998). Existen dos análogos de SR1 que se han utilizado para bloquear CB<sub>1</sub>, el AM251 y el AM281. Otro antagonista competitivo, que difiere estructuralmente de SR1, es el LY320135. En relación con CB<sub>2</sub> existen otros dos antagonistas selectivos, el AM630 y el O1184. Se ha descrito que ciertos ligandos, que hasta la fecha habían sido considerados antagonistas, son capaces de inhibir esta actividad constitutiva de los receptores. Estos compuestos se han denominado **agonistas inversos**. Se ha estudiado la capacidad de agonista inverso de ciertos de los compuestos arriba mencionados como el SR1, el SR2, el AM281, el LY320135, el AM630 y el O1184.

### Inhibidores de la recaptación y de la degradación de endocannabinoides.

Los endocannabinoides, más concretamente la AEA, son liberados al espacio intersináptico, por un mecanismo de difusión facilitada bidireccional, realizada a favor de un gradiente de concentración (Hillard et al. 1997) y posteriormente son recaptados de forma selectiva tanto por neuronas como por células gliales, donde son degradados rápidamente a etanolamina y el correspondiente ácido graso (ácido araquidónico), en el caso de la AEA, por la enzima amido hidrolasa de ácidos grasos (Fatty Acid Amide Hydrolase; FAAH) (Di Marzo et al. 1999).

- Inhibidores de la recaptación

El bloqueo de la entrada de los endocannabinoides a la célula aumenta la concentración de estos en el espacio intersináptico. Entre estos compuestos están el AM404 ([Beltramo et al. 1997](#)), el AM374 ([Gifford et al. 1999](#)), el UCM707 y el VDM11.

- Inhibidores de la degradación

Los inhibidores de la enzima FAAH prolongan y aumentan los efectos del endocannabinoides. Entre los compuestos que inhiben esta actividad enzimática están el fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), el metilaraquidonilfluorofosfonato (MAFP), el URB532 y el URB597.

#### 4.2.3. Mecanismos de acción

Los principales mecanismos de acción en los que están implicados los cannabinoides son:

- Interacción con canales iónicos, inhibición de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N y P/Q ([Twitchell et al. 1997](#)) y activación de los canales de  $\text{K}^+$  ([Mackie et al. 1995](#)), estas interacciones están implicadas en la liberación de neurotransmisores y parecen estar asociadas exclusivamente a  $\text{CB}_1$ .
- Inhibición de la adenilato ciclasa, lo que da lugar a un descenso del AMPc intracelular ([Howlett 1984](#)).
- Activación de la cascada de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs)

En mamíferos existen 3 grupos de MAPK: ERK, JNK y p38-MAPK. La quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) implicada en la regulación del crecimiento y diferenciación celular. Los otros dos grupos incluyen a las quinasas reguladas por estrés: la quinasa N-terminal c-Jun (JNK) y p38-MAPK que están relacionadas con la regulación de la muerte celular (apoptosis). A través de estas cascadas, activadas por proteína G y/o segundos mensajeros como ceramidas, los cannabinoides pueden controlar la supervivencia y muerte celular ([Guzman et al. 2001](#)). Otras quinasas que pueden modular los cannabinoides son la PI3K/PDK/PKB, implicadas en la regulación del crecimiento y el metabolismo celular ([Gomez et al. 2000](#)).

- Regulación de factores de transcripción

Tras la activación o inhibición de las cascadas de quinasas se produce la regulación de factores de transcripción como CREB/ATF (cAMP-Response-Element-Binding protein/Activating-Transcription-Factor) ([Herring et al. 2001](#); [Bouaboula et al. 1996](#)), Fos/Jun y el Factor Nuclear kappa B (Nuclear factor-kappa B; NF- $\kappa$ B), este último regulador de varios genes implicados en inflamación, diferenciación y muerte celular.

- Acción sobre las citocinas

Se ha descrito que cannabinoides como el  $\Delta^9$ -THC alteran el balance de citocinas, disminuyendo la producción de citocinas IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  por los linfocitos Th1, asociados a procesos de inmunidad celular y aumentando la producción de citocinas IL-4 e IL-10 por linfocitos T cooperadores tipo 2 (Th2) implicados en la inmunidad humoral (Klein et al. 2000).

- Apoptosis, neuroprotección y glicoprotección

Se ha demostrado la capacidad de los cannabinoides de inducir apoptosis en células mononucleares (Schwarz et al. 1994), macrófagos, linfocitos (Zhu et al. 1998) y células gliales (Sanchez et al. 1998) entre otras. Otros estudios indican un papel protector en neuronas, frente a determinados estímulos tóxicos como la sobre-estimulación glutamatérgica (Skaper et al. 1996) y el daño oxidativo; también se ha observado una capacidad protectora en la muerte celular de oligodendrocitos inducida por falta de soporte trófico (Molina-Holgado et al. 2002) y un rescate de la apoptosis de astrocitos inducida por ceramida (Gomez et al. 2002).

- Producción de óxido nítrico (NO)

El NO es un radical libre que actúa como transductor de señales en diversos procesos celulares, dependiendo del entorno celular y la concentración. Es producido por dos tipos de enzimas, la óxido nítrico sintasa (NOS) constitutiva y la inducible. Los cannabinoides aumentan el NO a través de la activación de la forma constitutiva (Stefano et al. 2003), pero también se ha observado un efecto inhibitorio de la forma inducible activada por estímulos inflamatorios.

## 5. Cannabinoides y EM

Basados en un principio en experiencias anecdóticas de pacientes con EM que informaron de una mejoría en el alivio del dolor y la rigidez, así como una reducción de otros síntomas tras automedicarse con cannabis (Pertwee 2002; Chong et al. 2006), se comenzó a estudiar el posible efecto terapéutico de los cannabinoides en esta enfermedad.

Los estudios iniciales que investigaron el efecto antiespástico de los cannabinoides fueron poco extensos pero parecían mostrar una modesta mejoría en la espasticidad tras el uso de dronabinol (Petro & Ellenberger, Jr. 1981; Ungerleider et al. 1987). Greenberg (Greenberg et al. 1994) estudió en 10 pacientes el efecto de la marihuana fumada sobre la respuesta postural y no encontró diferencias, aunque los enfermos percibieron una mejoría clínica. Otro estudio con 16 pacientes no demostró beneficio en la espasticidad ni con  $\Delta^9$ -THC oral ni con extracto de cannabis, pero parecía que la dosis era insuficiente (Killestein et al. 2002). Wade (Wade et al. 2003) comparó los síntomas en dolor, espasticidad, espasmos, disfunciones urinarias y coordinación, de 18 enfermos de EM con un grupo control tras suministrar 2 tipos de cannabinoides: el CBD mejoró el dolor, el dronabinol mejoró el dolor, los espasmos, la

espasticidad y el apetito, la combinación de los dos mejoró los espasmos y la calidad del sueño.

En el estudio CAMS (Cannabinoids in Multiple Sclerosis) ([Zajicek et al. 2003](#)), un ensayo clínico, multicéntrico, de grupos paralelos, a doble ciego y controlado con placebo, se evaluó la eficacia antiespástica del  $\Delta^9$ -THC (Marinol®) y un extracto de cannabis (Cannador®) administrado por vía oral (con un contenido de 2,5 mg de  $\Delta^9$ -THC, 1,25 mg de CBD y un 5% de otros cannabinoides por cápsula) en 667 pacientes con esclerosis múltiple. La duración del estudio fue de 15 semanas. En las primeras 5 semanas se realizó una fase de escalada de dosis en función de la toxicidad (con un aumento de 5 mg de  $\Delta^9$ -THC a la semana), de la semana 6 a la 13 se realizó una fase de mantenimiento y durante la semana 14 se disminuyó la dosis (una cápsula dos veces al día). No se registraron diferencias entre los grupos en cuanto a la espasticidad. Sin embargo, el grupo que recibió tratamiento activo refirió también mejoría del dolor, los espasmos musculares y la calidad del sueño. Los porcentajes de mejoría de la espasticidad fueron de 61% (n=121), 60% (n=108) y 46% (n=91) para el extracto de cannabis,  $\Delta^9$ -THC y placebo, respectivamente. Sin embargo un seguimiento a 12 meses de este estudio encontró una ligera mejoría sobre la espasticidad ([Zajicek et al. 2005](#)). Esta mejoría hace suponer que un estudio más extenso en el tiempo podría aportar datos sobre la eficacia de las propiedades neuroprotectoras del  $\Delta^9$ -THC en la EM, por esto en la actualidad está en marcha el estudio CUPID (Cannabinoid Use in Progressive Inflammatory Brain Disease), que incluye 500 pacientes durante 3 años.

Un ensayo con Cannador® en 57 pacientes ([Vaney et al. 2004](#)), demostró una tendencia a la mejoría de la espasticidad, del sueño y la movilidad en el grupo tratado y otro ensayo con Sativex®, un extracto de cannabis que contiene cantidades iguales de  $\Delta^9$ -THC y CBD y se administra por vía sublingual en forma de spray, en 160 pacientes ([Wade et al. 2004](#)) demostró una mejoría en la espasticidad. De estos 160 pacientes 137 participaron en una extensión del estudio ([Wade et al. 2006](#)) en el que se observó que mantenía el efecto beneficioso obtenido originariamente ([Wade et al. 2004](#)) y que la interrupción repentina del cannabinoide no provocaba ningún síndrome de abstinencia.

Otros ensayos clínicos se han efectuado para valorar el efecto de diferentes cannabinoides (dronabinol, Cannador®,  $\Delta^9$ -THC, Sativex®, etc) en diversos aspectos de la EM como la incontinencia ([Brady et al. 2004](#); [Freeman et al. 2006](#)), el temblor ([Meinck et al. 1989](#)); ([Clifford 1983](#); [Fox et al. 2004](#)), el nistagmo ([Schon et al. 1999](#); [Dell'Osso 2000](#)), el dolor y el sueño ([Svendsen et al. 2004](#); [Notcutt et al. 2004](#); [Barnes 2006](#); [Rog et al. 2005](#)). Todos estos ensayos, que en unos casos mostraron diferencias significativas y en otros una tendencia entre los grupos tratados y los controles, sugieren un posible potencial de los cannabinoides para tratar diversos aspectos de esta patología, pero presentan algunas dificultades como la



idoneidad de los métodos para medir ciertos síntomas, problemas farmacocinéticos, tolerabilidad, forma de administración y efectos secundarios (Killestein & Polman 2004).

Más allá de estos efectos beneficiosos sobre determinados síntomas clínicos en la EM, los efectos inmunomoduladores (producción de citocinas) y neuroprotectores (apoptosis neuronal) vistos en modelos animales hacen de los cannabinoides potenciales sustancias terapéuticas en el tratamiento de pacientes de EM (Pryce & Baker 2005) con una respuesta insuficiente a terapias convencionales.

## 6. Cannabinoides y EAE

Los primeros estudios sobre la eficacia de los cannabinoides en el tratamiento de la EAE fueron realizados por Lyman (Lyman et al. 1989), administrando  $\Delta^9$ -THC a cobayas y ratas. En los animales tratados con  $\Delta^9$ -THC, antes de la inoculación, la enfermedad se previno completamente y en los tratados tras la inoculación se retrasó la aparición y el grado de los signos clínicos. Las médulas espinales de los animales tratados con  $\Delta^9$ -THC presentaban una menor inflamación. La administración de  $\Delta^8$ -THC (Wirguin et al. 1994) a ratas produjo un retraso en el comienzo, una menor incidencia, una menor duración pero no una reducción del grado de la enfermedad. La histología no presentaba diferencias entre los animales tratados con cannabinoide y con vehículo. Continuando con el modelo de rata Lewis, Achiron (Achiron et al. 2000) encontró como HU-211 disminuía el grado de la EAE en la fase efectora de la enfermedad pero no observaba efecto en las fases iniciales. Sánchez (Sanchez et al. 2006) observó que WIN-2 *in vivo* tenía un efecto reductor en la EAE pasiva y que este cannabinoide inducía, *in vitro*, apoptosis en células encefalitógenas en parte por la vía CB<sub>2</sub>.

Otros trabajos examinaron en modelos animales el efecto de los cannabinoides como un posible tratamiento agudo de ciertos síntomas asociados a la EM, como la espasticidad y el temblor (Baker et al. 2000). En ratones con EAE, WIN-2,  $\Delta^9$ -THC, metanandamida y JWH-133, pero no CBD, mejoraron estos síntomas en 10 minutos y hasta 1 hora tras la administración. Los efectos de WIN-2 fueron revertidos por SR1 y SR2, lo que ponía de manifiesto la implicación de ambos receptores. Estudios posteriores usando ratones deficientes en estos receptores demostraron que este efecto antiespástico está mediado principalmente por CB<sub>1</sub> (Pryce & Baker 2007).

En una aproximación más genética del sistema cannabinoide en la EAE, Pryce (Pryce et al. 2003), indujo la CREAE en animales deficientes en el receptor CB<sub>1</sub> y encontró, que no había diferencias en el inicio y pico de la enfermedad pero que una vez recuperados los animales control sin anomalías de dicho receptor, los animales deficientes mantenían un alto grado de enfermedad con menores niveles de neurofilamento y mayor actividad caspasa-3 en la médula espinal (Jackson et al. 2005). Se han descrito alteraciones en la expresión del receptor CB<sub>1</sub> en



los ganglios basales y en la corteza cerebral de animales EAE, donde se observó una disminución del número de receptores pero un aumento en su actividad (Berrendero et al. 2001). También se ha observado, en el modelo CREAE, disminución del receptor CB1 principalmente circunscritas a ciertas regiones relacionadas con el control motor (Cabranes et al. 2006), regiones en las que existía también reducción de los niveles de ligandos endocannabinoides (Cabranes et al. 2005). Un trabajo reciente con animales deficientes en los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> ha demostrado el papel crucial del receptor CB<sub>2</sub>, expresado en células encefalíticas, en el control de la inflamación asociado a la EAE (Maresz et al. 2007).

La administración de WIN-2, ACEA y JWH-015 tras la infección con el virus de Theiler (Arevalo-Martin et al. 2003) mejoró las funciones motoras, disminuyó la microglía activa y el número de células T CD4<sup>+</sup> en la médula espinal, la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y promovió la remielinización. Otro grupo (Croxford & Miller 2003) encontró mejoras con WIN-2 administrado antes, en el momento o después de comenzar los signos clínicos. WIN-2 aumentaba la susceptibilidad de estos animales a la infección viral y disminuía los niveles de ARNm del SNC que codificaba para citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6.

Por otra parte, los estudios del sistema endocannabinoide (Witting et al. 2006; Ortega-Gutierrez et al. 2005) y de los inhibidores de la recaptación (de Lago et al. 2006; Cabranes et al. 2005) y de la degradación (Ortega-Gutierrez 2005) en estos modelos de EM, han aportado datos adicionales sobre el importante papel de los cannabinoides no sólo inmunoregulador sino también neuroprotector, como sugieren diversos estudios en los últimos años, tanto ante los procesos de excitotoxicidad generada por el glutamato (Docagne et al. 2007) como posiblemente ante el daño generado por exceso de iones y NO (Jackson et al. 2005).

## II. OBJETIVOS

Los objetivos principales de este trabajo son el estudio del efecto de los cannabinoides sintéticos sobre la EAE, de algunos de los mecanismos implicados y de la modulación del sistema cannabinoide en pacientes de EM. Para su consecución, se han planteado los objetivos que se detallan a continuación:

1. Valoración clínica e histopatológica del tratamiento con un cannabinoide sintético, WIN-2, en la EAE activa y pasiva.
2. Análisis del efecto de WIN-2 sobre la tasa de apoptosis en células encefalitógenas y estudio de la señalización implicada en este fenómeno.
3. Determinación del papel de WIN-2 sobre la producción de citocinas proinflamatorias por células encefalitógenas.
4. Estudio de la acción de WIN-2 sobre el factor de transcripción NF- $\kappa$ B.
5. Valoración del efecto de WIN-2 sobre la vía p38 en células encefalitógenas.
6. Comparación de los niveles de expresión génica del receptor de cannabinoides CB<sub>2</sub> entre individuos neurológicamente sanos y enfermos de EM RR antes y después de 6 meses de tratamiento con IFN- $\beta$ .

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Animales de experimentación

En todos los experimentos se han utilizado ratas Lewis (Charles River, Francia) macho de peso comprendido entre 200 y 300 g criadas en nuestro laboratorio. Se mantuvieron 3 o 4 ratas por caja a temperatura ambiente constante ( $22 \pm 2$  °C) y una humedad relativa del 60 %, con ciclos de luz-oscuridad y acceso ilimitado a agua y comida.

Todos los tratamientos se llevaron a cabo de acuerdo con las «European Union guidelines» (86/609/EU) para el uso de animales de laboratorio.

#### 2. Inducción de la EAE

##### Inducción activa

Los animales fueron anestesiados con Halotano (Fluothane®) e inmunizados subcutáneamente en las almohadillas de las patas traseras con 100  $\mu$ l (50  $\mu$ l por pata) de un homogeneizado que contenía: 50  $\mu$ g de MBP de cobayo (M-2295) (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), 500  $\mu$ g de *Mycobacterium tuberculosis* inactivada, cepa H37 RA (Difco, Detroit, MI, EE.UU.) y 50  $\mu$ l de adyuvante incompleto de Freund (Difco).

A los animales de control se les inyectó una solución sin MBP que contenía 500  $\mu$ g de *M. tuberculosis* inactiva, 50  $\mu$ l de adyuvante incompleto de Freund y 50  $\mu$ l de suero fisiológico.

##### Transferencia pasiva

Las células utilizadas para la transferencia pasiva se obtuvieron de ganglios linfáticos y bazo de ratas Lewis macho sacrificadas el día 10 post inoculación (PI) a las que se inyectó MBP de cobaya y CFA. Después de disgregar por separado ganglios y bazo, los esplenocitos y las células linfoides se resuspendieron en medio RPMI-CLICK (RPMI-1640, glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, aminoácidos esenciales y no esenciales,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,21 M (Gifco Lab., EE.UU.), penicilina 100 U/ml, estreptomycin 10 mg/ml y suero bovino fetal al 10%) (SBF) (Cambrex Bio Science Walkersville, MD, EE.UU.) a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml y se cultivaron a 37°C en atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> durante 72 h con 5  $\mu$ g/ml de MBP de cobaya.

Transcurridas 72 h, se recolectaron las células y se lavaron 2 veces en medio de Hanks mediante 5 minutos de centrifugación a 1200 r.p.m. Por último se determinó el número de células viables y se resuspendieron a razón de  $20 \times 10^6$  células viables/ml en PBS estéril. A las

ratas anestesiadas con Halotano (Fluothane®) se les inyectó en una de las venas laterales de la cola 0,5 ml de la suspensión celular ( $20 \times 10^6$  células).

### 3. Evaluación de los signos clínicos

Todos los animales inoculados se examinaron diariamente con el fin de recabar información sobre las alteraciones neurológicas de la EAE. Para ello se utilizó la siguiente escala clínica: 0, sin signos clínicos; 1, pérdida del tono de la cola; 2, pérdida de fuerza de la cola; 3, pérdida de fuerza en las patas traseras (paraparesia); 4, parálisis de las patas traseras (paraplejía); 5, tetraplejía; 6, muerte debida a la EAE. Los grados 4 y 5 se acompañaron habitualmente de incontinencia fecal y urinaria. Simultáneamente se anotó el peso de los animales estudiados.

### 4. Cultivo primario de células encefalitógenas reactivas a MBP

Se realizó la inducción activa de la EAE como se ha descrito anteriormente con una emulsión de 50  $\mu$ g de MBP en 50  $\mu$ l de adyuvante de Freund suplementada con 500  $\mu$ g de *M. tuberculosis* inactivada. Las ratas se sacrificaron en los días noveno y décimo tras la inoculación para extraer sus ganglios linfáticos poplíteos e inguinales, principales centros de estimulación antigénica, enriquecidos en linfocitos específicos de MBP en un momento previo a su migración hacia el SNC. Se extrajeron los bazo para aportar células presentadoras de antígeno (Antigen Presenting Cells; APCs) adicionales a las ya contenidas en los ganglios. Los ganglios linfáticos y bazo fueron disgregados y homogeneizados por separado con un émbolo de cristal y filtrados en una cazoleta a través de dos rejillas metálicas superpuestas, de 200  $\mu$ m, en presencia de RPMI- CLICK. Las soluciones de células de ganglios y de bazo se recogieron en sendas placas de Petri y a continuación se lavaron dos veces mediante centrifugación a 1500 r.p.m. durante 7 min en RPMI-CLICK.

Las células de ganglio linfático se resuspendieron en RPMI-CLICK y las células de bazo (esplenocitos) se trataron con una solución tampón hipotónica ACK (0,15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 mM  $\text{KHCO}_3$ , 0,1 mM EDTA) durante 7 min para lisar los hematíes, y tras dos lavados a 1500 r.p.m. de 7 min, las células se trataron con el antimetabólico Mitomicina C ( $0.5 \times 10^6$  células/ml), 30 min, impidiendo así su proliferación. Tras 3 lavados a 1500 r.p.m. de 7 min el pellet de células se resuspendió en RPMI-CLICK. Las células de ganglio y bazo se mezclaron y ajustaron a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml en RPMI-CLICK, en presencia de 20  $\mu$ g/ml de MBP y se cultivaron en incubador a 37% y con 5% de  $\text{CO}_2$ , durante 2,5-3 días.

Pasado este periodo de tiempo se realizó una centrifugación en gradiente de densidad (30min a 1500 r.p.m.), en una proporción de 8 ml de células sobre 3 ml de Lymphoprep (Axis-Shield, PoC AS, Oslo, Noruega). Tras la centrifugación se recogió la interfase enriquecida en linfocitos T específicos de MBP y se diluyó progresivamente en RPMI-CLICK hasta una concentración final de  $0,75 \times 10^6$  células/ml, en presencia de interleucina-2 recombinante de rata (r-IL-2) (R&D System, Abingdon, Reino Unido) a una concentración de 1,6 ng/ml. La r-IL-2 mantuvo y estimuló el crecimiento del cultivo primario de linfocitos T autorreactivos. En esta fase, como consecuencia de su reestimulación *in vitro* los linfocitos aumentaron de tamaño y presentaron formas alargadas, morfología que se hace más patente tras 48 horas de incubación con r-IL-2. En este momento coexistían formas alargadas con formas redondas, estas últimas preludio de división mitótica. Transcurridos 5 días desde la puesta en cultivo con rIL-2 (7 días desde su obtención de los animales) las células presentaban formas alargadas más pequeñas, y la viabilidad del cultivo descendió en torno a un 30%.

En este punto los linfocitos T en cultivo específicos de MBP se reestimularon con APCs (provenientes de ratas singénicas sanas) y con MBP soluble. El cultivo se mantuvo mediante rondas de estimulación y expansión hasta obtener el número deseado de células.

## 5. Tratamientos

Para su administración, WIN 55,212-2 (Sigma) se disolvió en una solución compuesta por salino 0.9%, etanol y Tween-80 (90:5:5 v/v) la cual fue asimismo empleada como vehículo para inoculación de los animales de control. El tratamiento se administró por vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen de 0.5 ml.

Los tratamientos realizados fueron los siguientes:

En la **EAE activa**

- WIN-2 (n=5) 2 mg/kg de día 0 a día10 post-inoculación (PI) y 4 mg/kg de día 11 a día 22 PI.

Los animales controles fueron tratados en paralelo con un volumen equivalente de vehículo.

En la **EAE pasiva** se realizaron dos tratamientos diferentes

- Tratamiento I: WIN-2 (n=5): 2 mg/kg de día 0 a 8 post-transfección (PT).
- Tratamiento II: WIN-2 (n=5): 4 mg/kg en días 0-2 PT, 4.5 mg/kg en día 3 PT, 5 mg/kg en día 4 PT, 5.5 mg/kg en día 5 PT, 6 mg/kg en día 6 PT, 6.5 mg/kg en día 7 PT, 7 mg/kg en día 8 PT. Los animales controles fueron inyectados en paralelo con un volumen equivalente de vehículo.

Todos los animales tratados con WIN-2 y vehículo se examinaron diariamente 24 horas después de la última dosis administrada para evitar que el potencial efecto analgésico y psicoactivo del cannabinoide pudiera interferir con la valoración de los signos clínicos. Simultáneamente se anotó a diario el peso de los animales.

## 6. Obtención de tejido del SNC

Una vez realizados los tratamientos con WIN-2 y comprobados los días en que se observaron las mayores diferencias en signos clínicos entre los animales tratados con WIN-2 y con vehículo, se repitió el experimento sacrificando animales en esos días de máximas diferencias. Se sacrificaron 5 ratas por grupo en el día 13 PI para la EAE activa, en día 7 PT para la EAE pasiva y 5 ratas de los dos grupos controles tratados con vehículo. Paralelamente se obtuvo tejido de tres animales no inmunizados.

Los animales se anestesiaron con diazepam/ketamina (4:6), se perfundieron mediante punción cardiaca con suero fisiológico y se procedió a la extracción de la médula espinal. La parte lumbar de la médula espinal se fijó en paraformaldehído al 10% hasta su inclusión en parafina.

## 7. Estudios histológicos

Tras la fijación en paraformaldehído al 10%, las muestras de médula espinal se incluyeron en bloques de parafina. Las piezas en parafina se cortaron en secciones de 4-5 micras de grosor en un microtomo (Leica RM-2135) y se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E). La presencia de infiltrados en la médula espinal se clasificó como infiltración perivascular (pv) y parenquimatosa (pq).

## 8. Protocolo de activación celular y tinción de citocinas

Las células ( $2 \times 10^6$  células/ml), cultivo primario de células reactivas a MBP, se activaron con la combinación de acetato de forbol mirístico (Phorbol Myristate Acetate, PMA)/ionomicina (Sigma), un potente estímulo que permite valorar la capacidad de producción de citocinas por parte de diferentes subpoblaciones linfocitarias. El primero activa directamente a la proteína quinasa C y el segundo es un ionóforo que permite la entrada de calcio a la célula, aumentando los niveles de calcio intracelular. De esta forma se consigue una rápida activación celular en ausencia de antígeno, simulando las diferentes señales intracelulares que tienen lugar tras el reconocimiento del mismo. La dosis de PMA utilizada fue de  $0,1 \mu\text{g/ml}$  y la de ionomicina de  $1 \mu\text{g/ml}$ .

La incubación se llevó a cabo en placas de 24 pocillos a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  y 96% de humedad. Transcurrido el periodo de activación y tratamiento, las células se fijaron con 1 ml de solución lisante FACS (Becton Dickinson, San Jose, CA, EE.UU.) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con el fin de fijar los epítomos externos y ayudar a la permeabilización. A continuación, se lavaron con 2 ml de PBS y se mantuvieron con  $500 \mu\text{l}$  de

la solución permeabilizante FACS (Becton Dickinson) durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, para facilitar el acceso de los anticuerpos anti-citocina, marcados con ficoeritrina (Phycoerythrin; PE), al interior celular.

A continuación se añadieron los anticuerpos anti-citocina o los isotipos correspondientes y se incubó a 4°C durante 30 min en oscuridad.

Los anticuerpos usados fueron:

- R-PE-Conjugated Mouse Anti-Rat IFN- $\gamma$  Monoclonal Antibody (BD PharMingen, San Diego, CA, EE.UU.).
- R-PE-Conjugated Hamster Anti-Rat/Mouse TNF- $\alpha$  Monoclonal Antibody (BD PharMingen).
- R-PE-Conjugated Mouse Anti-Rat IL-4 Monoclonal Antibody (BD PharMingen).
- R-PE-Conjugated Mouse Anti-Rat IL-10 Monoclonal Antibody (BD PharMingen).
- R-PE-Conjugated Mouse Rat IgG<sub>1</sub> Isotype Control Immunoglobulin (BD PharMingen), que se usó como isotipo.

Durante las últimas 4 h de cultivo se añadió brefeldina A (BFA) (Sigma), un inhibidor del transporte intracelular de proteínas que facilita que éstas queden retenidas en el interior celular, a una concentración final de 10  $\mu$ g/ml.

Tras mantenerlos durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, se lavaron con PBS-Albúmina al 0,5% para eliminar el exceso de anticuerpo y se resuspendieron en formaldehído al 2% hasta su adquisición en el citómetro de flujo. Las muestras se analizaron en un citómetro FACScan™ (Becton-Dickinson). La adquisición se realizó en el programa LYSYS II y el análisis en el programa PAINT-A-GATE (Becton-Dickinson).

## 9. Protocolo de tinción para estudiar apoptosis

Para la detección de la apoptosis temprana se empleó la técnica de tinción con Anexina-V marcada con fluoresceína isotiocinato (Fluorescein iso-thiocyanate; FITC) (BD PharMingen). La Anexina-V es una proteína que en presencia de Ca<sup>2+</sup> se une con gran afinidad a una fosfatidil serina característica de la superficie interna de la membrana plasmática, que en los procesos tempranos de apoptosis se transloca a la cara externa. Aquellas células que son Anexina-V<sup>+</sup> son células en apoptosis.

Las células se resuspenden en tampón de unión a Anexina (BD PharMingen), se añade Anexina-V FITC, a una concentración final de 0,5  $\mu$ g/ml y se incuban 10 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Posteriormente y antes del análisis se añadieron 20  $\mu$ g/ml de yoduro de propidio (IP), que marca degradación del ADN. Las células se adquirieron y analizaron igual que en el apartado anterior.

## 10. DAPI

La apoptosis se midió con el fluorocromo DAPI (4',6. diamidina-2-fenilindol) (Sigma). Las células se lavaron y fijaron a portas pretratados con poly-L-lysine. Los portas se incubaron 15 min a temperatura ambiente y se lavaron 2 veces con PBS. Se aplicó DAPI (1 µg/ml; 100 µl) a cada porta y se incubó 10 min en oscuridad a temperatura ambiente. Se lavaron 2 veces con PBS, se montaron las preparaciones con el medio fluoroprep y se analizaron con microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E800). Las células apoptóticas se identificaron por un núcleo azul brillante característico de la cromatina condensada y fragmentada.

## 11. Determinación de viabilidad celular por ensayo de MTT

El ensayo del MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) (Sigma) se utiliza como método para cuantificar colorimétricamente la viabilidad celular en estudios de proliferación celular y citotoxicidad. Se basa en la característica que tienen las sales amarillas de tetrazolio, como el MTT, que al fragmentarse forman un derivado del formazán insoluble en medio acuoso de color azul intenso; esta rotura es producida por la acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, activa solamente en las células vivas.

Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos en presencia de WIN-2 o del vehículo dimetilsulfóxido (DMSO). Transcurrido el tiempo de incubación requerido (según el experimento) a cada pocillo se le añadió MTT a una concentración final de 0.5 mg/ml. Tras 4 h de incubación los cristales insolubles de formazán se disolvieron en buffer de lisis (20% dodecil sulfato sódico (SDS) y 50% dimetilformamida (DMF)). Se midió la absorbancia de las disoluciones obtenidas en los diversos pocillos en un lector de placas de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), a una longitud de onda de 570 nm.

El valor neto de absorbancia fue expresado en forma de porcentaje, dando el valor 100% de viabilidad a la absorbancia neta de las células de control, directamente proporcional al número de células metabólicamente activas. En cada ensayo se realizaron todas las condiciones por triplicado; además, cada estudio se repitió 3 veces

## 12. Western Blot

Las células se lavaron en PBS 1X y recolectaron en un tampón de lisis (1% NP-40, 137mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH=7.4, 10% glicerol, 20mM β-Glicerolfosfato) en presencia de inhibidores de proteasas (1mM DTT, 1 µg/ml Leupeptina, 1 µg/ml Aprotinina y 1mM PMSF) y fosfatasas (200mM NaF, 0.1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) durante 10 minutos a 4°C. Los extractos celulares se centrifugaron a 14000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C. La cantidad de proteína de los extractos se cuantificó usando el método Bradford "BioRad Protein Assay" (BioRad, CA, EE.UU.).



A continuación, las proteínas se cargaron en geles de acrilamida tras añadir el tampón de carga (Laemmli 5X: 15ml H<sub>2</sub>O, 2.5ml Tris-HCl pH 6.8 1M, 10ml Glicerol, 8ml SDS 10%, 2ml  $\beta$ -Mercaptoetanol, 500  $\mu$ l Azul Bromofenol 0.5% en H<sub>2</sub>O) y desnaturalizar la muestra a 100°C durante 5 minutos.

Se cargaron 25  $\mu$ g de proteína total en geles de poliacrilamida de distinto porcentaje en función del peso molecular de la proteína a analizar y se realizó la electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Una vez separadas las proteínas por su peso molecular, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Reino Unido) aplicando un amperaje constante en función de la proteína. Finalizado este proceso, la membrana se bloqueó con leche desnatada en polvo al 5% en T-TBS (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM y Tween-20 al 0.1%) y tras tres lavados de 10 minutos en T-TBS, se incubó con el anticuerpo primario. En el caso de los anticuerpos contra formas no fosforiladas se realizaron generalmente diluciones 1:300 de 0.5% BSA en T-TBS y se realizaron incubaciones de 2 horas a temperatura ambiente. Para las formas fosforiladas se realizaron diluciones 1:1000 en 5% BSA en T-TBS y las incubaciones fueron de al menos 16 horas a 4°C.

Tras tres lavados de 10 min en T-TBS se incubaron las membranas con un anticuerpo secundario a una dilución 1:2000 en T-TBS, conjugado con peroxidasa de rábano. Para el revelado se utilizó el método de quimioluminiscencia ECL (Amersham).

Los anticuerpos utilizados fueron:

- Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EE.UU.)
- Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (G9) (Cell Signaling Technology)
- Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology)
- Caspase-10 (Cell Signaling Technology)
- Caspase-3 (Cell Signaling Technology)
- Bax (Cell Signaling Technology)
- Bcl-2 (N-19)-G (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.)
- Anti- $\alpha$ -Tubulin clone DM 1<sup>a</sup> (Sigma)
- CB<sub>2</sub> Receptor Polyclonal Antibody (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EE.UU.)
- Anti-Caspase-12 (NT) (ProSci Incorporated, Poway, CA, EE.UU.)

Como anticuerpos secundarios se usaron:

- Anti-mouse Ig, Horseradish Peroxidase (Amersham)
- Anti-rabbit Ig, Horseradish Peroxidase (Amersham)

### 13. Transfecciones y ensayo de actividad luciferasa

Para examinar si los cannabinoides interfieren en la activación del factor NF- $\kappa$ B se clonó el sitio de unión de NF- $\kappa$ B del gen MMP-9 (secuencia -600 a -590) (Eberhardt et al. 2000) en el sitio XhoI del plásmido pGL3-promoter (que contiene el gen luciferasa de Firefly bajo control del promotor SV-40) (kB-pGL3-prom), se transfectaron células Jurkat con la construcción (kB-pGL3-prom) o el vector vacío (pGL3-prom), se cultivaron en presencia de WIN-2 y se midió la actividad luciferasa resultante en cada ensayo.

Las células Jurkat ( $2 \times 10^6$ ) se electroporaron a 270 V y 960  $\mu$ F en cubetas de 0.4 cm en un Bio-Rad Gene Pulser (BioRad), con 5  $\mu$ g del plásmido kB-pGL3-prom o pGL3-prom. Cada muestra se cotransfectó con 1  $\mu$ g del plásmido pRL-TK, que contiene el cDNA codificante de luciferasa de Renilla (Promega Corporation, Madison, WI, EE.UU.) bajo el control de un promotor constitutivamente activado de timidina kinasa que se utiliza de control interno de la transfección. Tras 20 h, las células se dividieron en las diferentes condiciones de cultivo. Las células se estimularon durante 3 h con 20 ng/ml de PMA. La extracción de proteínas y las determinaciones de luciferasa se realizaron según el sistema Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). La actividad de la luciferasa se midió en un luminómetro Sirius Luminometer (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Alemania). La actividad relativa de la luciferasa de Firefly fue analizada respecto a la de la luciferasa de Renilla en cada experimento para normalizar los resultados debido a la distinta eficiencia en las transfecciones.

### 14. Selección de pacientes y obtención de muestra de sangre

Se tomaron muestras de sangre, en tubos con heparina de litio, de pacientes con EM RR activa antes y después de 6 meses de tratamiento con cualquiera de los interferones beta-1a o beta-1b (EMRR+ IFN- $\beta$ ) y de individuos neurológicamente sanos (controles).

Todos los pacientes del estudio recibieron información sobre el fundamento, el manejo de las muestras y la confidencialidad del estudio y firmaron un consentimiento informado. Un determinado número de pacientes no pudo ser analizado por haber recibido tratamientos recientes con inmunosupresores o inmunomoduladores o por haber sufrido recaídas en el mes previo a la toma de la muestra.

### 15. Separación de poblaciones linfocitarias

De cada muestra se separaron las tres poblaciones a estudiar, células B, NK y T por el método RosetteSep® (Stem Cell Technologies Inc, Vancouver, BC, Canada), basado en una selección negativa. Las células no deseadas se marcaron con anticuerpos contra antígenos de superficie y se eliminaron. Se comprobó el rendimiento del kit de separación con una alícuota

de cada población de células separadas marcada con tres anticuerpos monoclonales conjugados con distintos fluoróforos: anti-CD19-TC (Tercer Color) para células B, anti-CD56-PE para células NK y con anti-CD3-FITC para células T.

Tras el marcaje las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSort (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) con el programa informático "CELLQuest" y se analizaron posteriormente los resultados con el programa "Paint-a-gate Pro".

## 16. Extracción de ARN

Se realizó la extracción del ARN de las tres poblaciones de células separadas con el método de extracción comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.).

## 17. Síntesis de ADNc

El ARN extraído (400 µg) se retrotranscribió a ADNc usando el kit GeneAmp gold RNA PCR Core Kit para RT-PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) para analizar la expresión de CB<sub>2</sub>, así como el gen de referencia subunidad A del complejo succinato deshidrogenasa (SDHA) en todas las muestras.

La reacción se llevó a cabo en termociclador (Perkin-Elmer, Cetus, Foster City, California, USA) con un volumen final de 20 µl por muestra que incluían: 15 unidades de la enzima AMV, 10 unidades de inhibidor de ARNasa, dNTPs 1 mM (0.25 mM cada uno de ellos), MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM DTT 10 mM buffer 1x y cebadores *random hexamers* 1.25 mM. Para la síntesis del ADNc, las muestras eran sometidas a un ciclo de 10 minutos a 25°C seguido de uno de 12 minutos a 42°C donde se producía la síntesis propiamente dicha.

## 18. Cuantificación a tiempo real (Real Time PCR)

El ADNc sintetizado fue amplificado mediante una reacción de PCR a tiempo real. Es una técnica basada en una reacción de PCR en la que se va incorporando un fluoróforo a las cadenas de ADN que se van sintetizando en cada ciclo de amplificación. Así, es posible cuantificar el aumento de fluorescencia de un ciclo respecto al anterior y a través de una serie de equivalencias la cantidad de ADN que había en la muestra de partida. El fluoróforo usado para el marcaje del ADN, el SYBER Green I, es un marcador de ADN de doble cadena que aumenta su fluorescencia en 100 veces cuando se une específicamente al surco estrecho (hendidura secundaria) de la doble hélice de ADN.

Se amplificaron dos genes humanos, el gen diana CB<sub>2</sub> y el gen de referencia SDHA, como control de la presencia e integridad del ARN.

Las dos parejas de cebadores fueron sintetizadas por Roche Applied Science y sus secuencias fueron:

Cebadores de SDHA: (directo) 5' TGGGAACAAGAGGGCATCTG 3'

(reverso) 5' CCACCACTGCATCAAATTCATG 3'

Cebadores de CB<sub>2</sub>: (directo) 5' GGAGAGGACAGAAAACAACTGG 3'

(reverso) 5' CCACTGAGCTTGTCTAGAAGGC 3'

Los niveles de expresión de CB<sub>2</sub> se calcularon mediante cuantificación relativa, en la que se normalizaron a la media geométrica del gen de referencia (SDHA), como el cociente entre el CB<sub>2</sub> y el valor control (media geométrica) para cada muestra. La concentración relativa de cada gen y la del gen de referencia se calculó por interpolación con una curva estándar de cada uno de los genes. Esta curva estándar se generó mediante diluciones seriadas de ADNc de los controles positivos, y se usaron las mismas diluciones para todos los casos. Todas las amplificaciones incluían un control positivo y un control negativo.

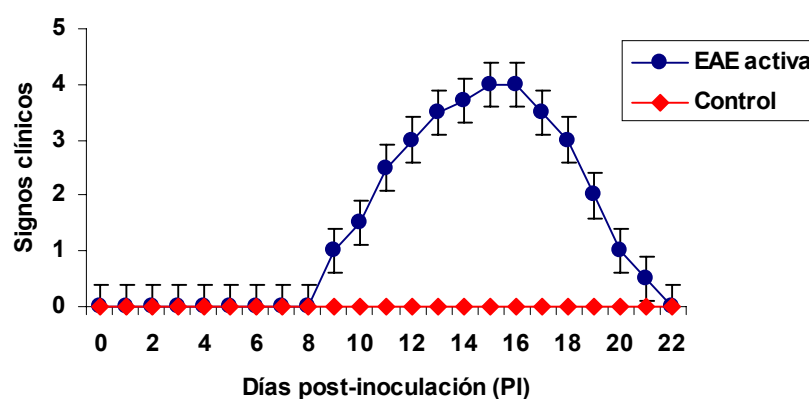
La PCR a tiempo real se llevó a cabo en un Light-Cycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) usando el kit LightCycler-FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I Kit (Roche Diagnostics). El proceso de cuantificación para todos los genes se inició con una desnaturalización de 95°C durante 10 min seguida de 35 ciclos donde las temperaturas de hibridación eran las específicas de cada gen. Por último, las curvas de desnaturalización ("melting curve") de los productos de PCR se analizaron tras cargar los productos de PCR en geles de poliacrilamida no desnaturalizante al 8% junto con un marcador de peso molecular, para comprobar que se correspondían con los fragmentos esperados. Las diferentes bandas se secuenciaron en un aparato ABI Prism<sup>TM</sup> 377 DNA (Applied Biosystem).

Los datos se introdujeron en una base de datos de programa Microsoft ACCESS y se analizaron con el programa estadístico SPSS 10.0.

## IV. RESULTADOS

### 1. Obtención de la EAE aguda monofásica de forma activa y pasiva

En los primeros experimentos se comprobó que la inmunización de ratas Lewis, tanto de forma activa como pasiva, inducía una forma de EAE aguda-monofásica. La EAE inducida de forma activa se caracterizaba por un inicio de la sintomatología clínica entre los días 9 y 10 PI, observándose pérdida de fuerza en la cola (grado 1) y alcanzándose el máximo de enfermedad en los días 13 y/o 14 PI, con paraplejía y/o con tetraplejía (grado 4 y 5) (**Figura 2**). A partir de este día se iniciaba una recuperación progresiva de los animales, llegando a desaparecer totalmente los signos neurológicos de la enfermedad. En la **Figura 3** se muestra una rata con parálisis de las patas traseras (grado 4).



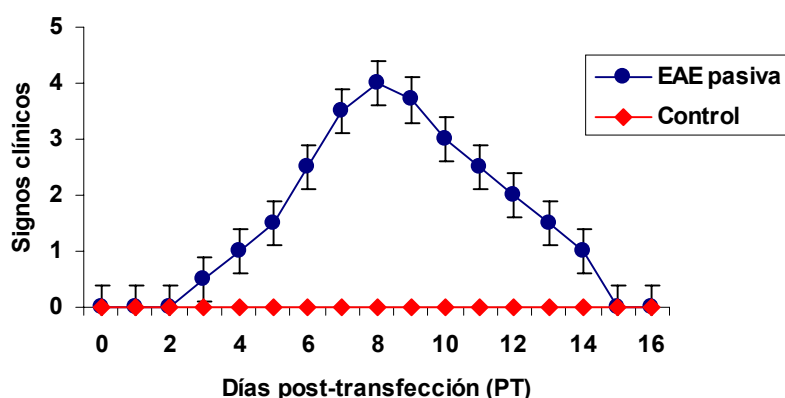
**Figura 2.** Signos clínicos en la inducción activa de la EAE aguda-monofásica. Los animales **EAE activa** (5 ratas) fueron inoculados con un volumen de 100  $\mu$ l que contenía 50  $\mu$ g MBP de cobayo y CFA (500  $\mu$ g de *Mycobacterium tuberculosis* y 50  $\mu$ l de adyuvante incompleto de Freund) y los animales **Control** (5 ratas) fueron inoculados 100  $\mu$ l que contenían CFA y suero fisiológico en sustitución de la MBP.



**Figura 3.** Rata Lewis con **EAE** en **13PI** con parálisis de las patas traseras (grado 4 de la enfermedad).

La EAE inducida de forma pasiva se caracterizaba por un inicio de la sintomatología clínica entre los días 4 y 5 PT, observándose pérdida de fuerza en la cola (grado 1) y alcanzándose el máximo de enfermedad en los días 8 y/o 9 PT, con pérdida de fuerza en las patas traseras y/o paraplejía (grado 3 y 4) (**Figura 4**). A partir de este día se iniciaba una recuperación progresiva de los animales, llegando a desaparecer totalmente los signos neurológicos de la enfermedad. Como animales control se inoculaban ratas con CFA-suero, que permanecieron sanas a lo largo de todo el periodo de tiempo estudiado.

En ambas formas se logró inducir la EAE en la totalidad de los animales inoculados y no sufrieron nuevas recaídas



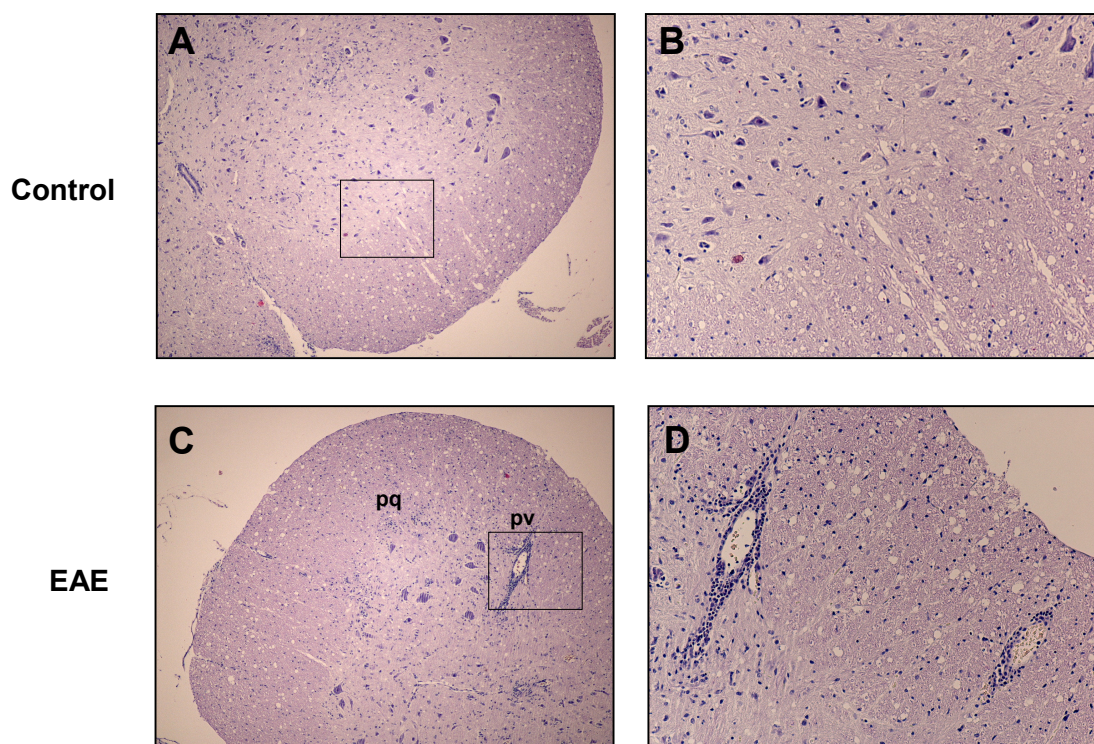
**Figura 4.** Signos clínicos en la inducción pasiva de la EAE aguda-monofásica. A los animales **EAE pasiva** (5 ratas) se les inyectó en una de las venas laterales de la cola 0,5 ml de una suspensión celular que contenía  $20 \times 10^6$  células provenientes de un cultivo de células encefalíticas obtenidas a día 10 PI de animales EAE inoculados de la forma activa. Los animales **Control** (5 ratas) fueron inoculados con el mismo volumen de suero fisiológico sin células.

### 1.1. Estudio de anatomopatológico de la EAE activa y pasiva

La tinción con H&E permite localizar células mononucleares infiltradas en el SNC, lo que constituye una de las características patológicas mejor estudiadas de la EAE. En la **Figura 5 A** y **B** se muestra en una imágenes de microscopía óptica la ausencia de células inflamatorias en el SNC en animales controles. En las **Figura 5 C** y **D**, obtenidas de un corte de médula espinal de un animal con EAE en 13PI se pueden apreciar la existencia de infiltrados perivasculares y parenquimatosos. El grado de infiltración celular se correlacionaba estrechamente con los síntomas desarrollados por los animales.



Por otra parte, se utilizó la tinción de Klüver-Barrera para analizar desmielinización, no encontrándose esta característica patológica en ninguno de los grupos estudiados (datos no mostrados).

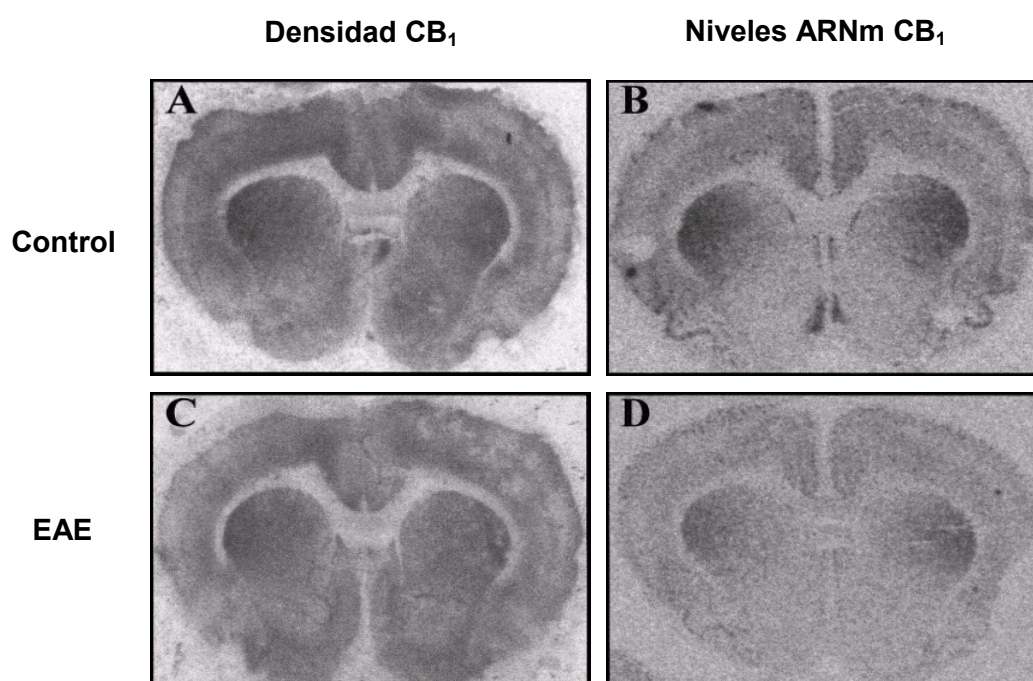


**Figura 5.** Estudio histopatológico de secciones de médula espinal, zona lumbar, de ratas Lewis teñidas con H&E. Los animales **Control** (A y detalle en B) no muestran infiltración celular, mientras que los animales **EAE 13 PI** (C y detalle en D) presentan infiltración perivascular (pv) y parenquimatosa (pq).

## 2. Estudio de CB<sub>1</sub> en ratas EAE

Para obtener datos acerca de los cambios que se producen en el receptor CB<sub>1</sub> en la EAE se realizó el siguiente estudio en colaboración con el Dr. Fernández-Ruiz del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Tras la inoculación activa con proteína básica de mielina en adyuvante completo de Freund los animales se pesaron y se exploraron a diario para detectar la aparición de afectación neurológica. Los primeros síntomas aparecieron hacia el día 9 después de la inoculación, alcanzando su máximo grado el día 13 (paraplejía), momento en el que se sacrificaron los animales. El cerebro se extrajo tras perfusión del animal por vía intracardíaca con PBS y se utilizó para la determinación de la densidad de los receptores CB<sub>1</sub>, mediante autorradiografía, para la medida de los niveles de ARNm mediante hibridación in situ, y para el estudio de la actividad de estos receptores, analizando la actividad GTPasa de las proteínas G a las que están acoplados estos receptores (Ver artículo [\(Berrendero et al. 2001\)](#)).

Los resultados obtenidos demostraron que los receptores CB<sub>1</sub> no presentaban cambios significativos, ni en densidad ni en niveles de ARNm, en la mayor parte de las regiones cerebrales (hipocampo, estructuras límbicas y cerebelo) de los animales inoculados. Sin embargo, se observó un descenso muy marcado en ambos parámetros a nivel del caudado-putamen, tanto en la parte lateral como medial (**Figura 6**). También se observó disminución de la densidad, pero no de los niveles de ARNm, del receptor CB<sub>1</sub> en la corteza cerebral. Los estudios de actividad, tras activación con WIN-2, demostraron que a pesar de la disminución del número de receptores CB<sub>1</sub>, estos se unían más eficientemente a proteína G tanto en el caudado-putamen como en la corteza cerebral en las ratas EAE.



**Figura 6.** Autorradiogramas representativos (4X) correspondientes a los análisis de densidad y niveles de ARNm de CB<sub>1</sub> obtenidas de secciones coronales, lámina # 16 del atlas estereotáxico (Paxinos & Watson 1986), de 20  $\mu$ m de cerebros de animales **Control (A y B)** y **EAE (C y D)**. Se observa un descenso en ambos parámetros en el caudado-putamen en los animales EAE. Colaboración con el Dr. Fernández-Ruiz, Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.

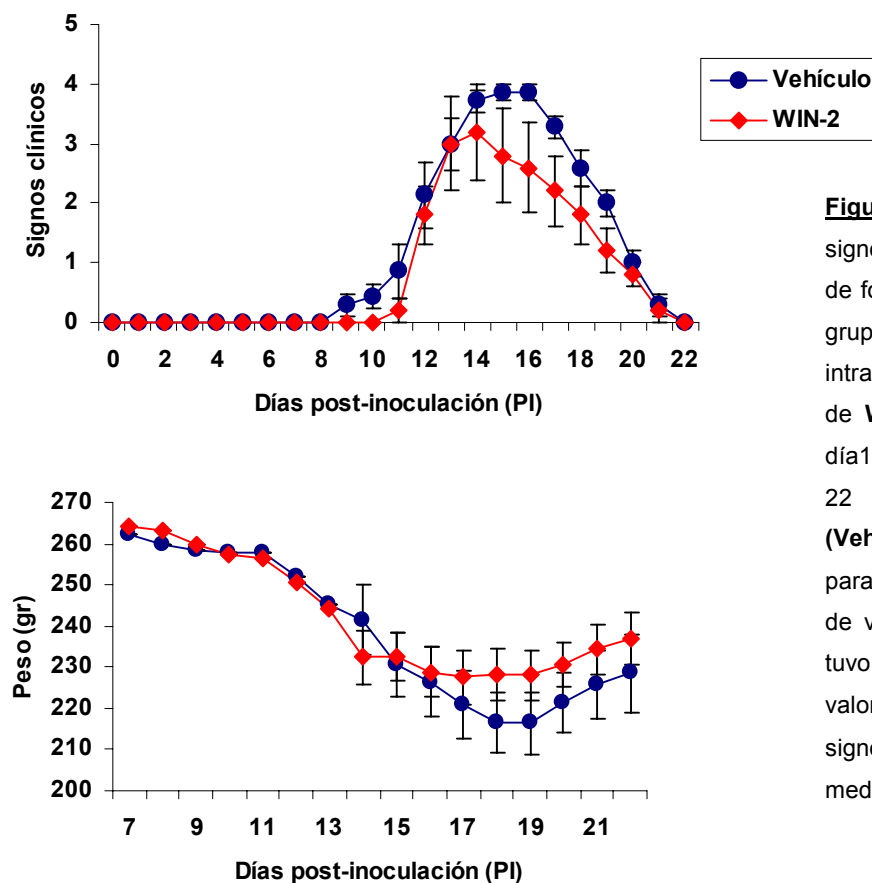
### 3. Estudio del tratamiento con cannabinoides en la EAE activa y pasiva

#### 3.1. Efecto en las manifestaciones clínicas de la EAE activa

En este estudio se utilizaron ratas Lewis macho inmunizadas activamente como se ha descrito en materiales y métodos. Los animales inmunizados se trataron diariamente con WIN-



2. En los animales control, tratados con el vehículo, la enfermedad se desarrolló de forma aguda monofásica tal y como se ha descrito (**Figura 2**). Con esta pauta de tratamiento no se observó ninguna mejoría significativa en los signos clínicos de los animales tratados con WIN-2 al compararlos con el grupo vehículo (**Figura 7**).



**Figura 7.** WIN-2 no suprime los signos clínicos de la EAE inducida de forma activa. Cinco animales por grupo se trataron por vía intraperitoneal con una dosis diaria de WIN-2 de 2 mg/kg de día 0 a día 10 PI y 4 mg/kg de día 11 a día 22 PI. Los animales controles (**Vehículo**) fueron tratados en paralelo con un volumen equivalente de vehículo. El tratamiento tampoco tuvo efecto en la curva de peso. Los valores indican la media de los signos clínicos  $\pm$  error estándar de la media de cada día.

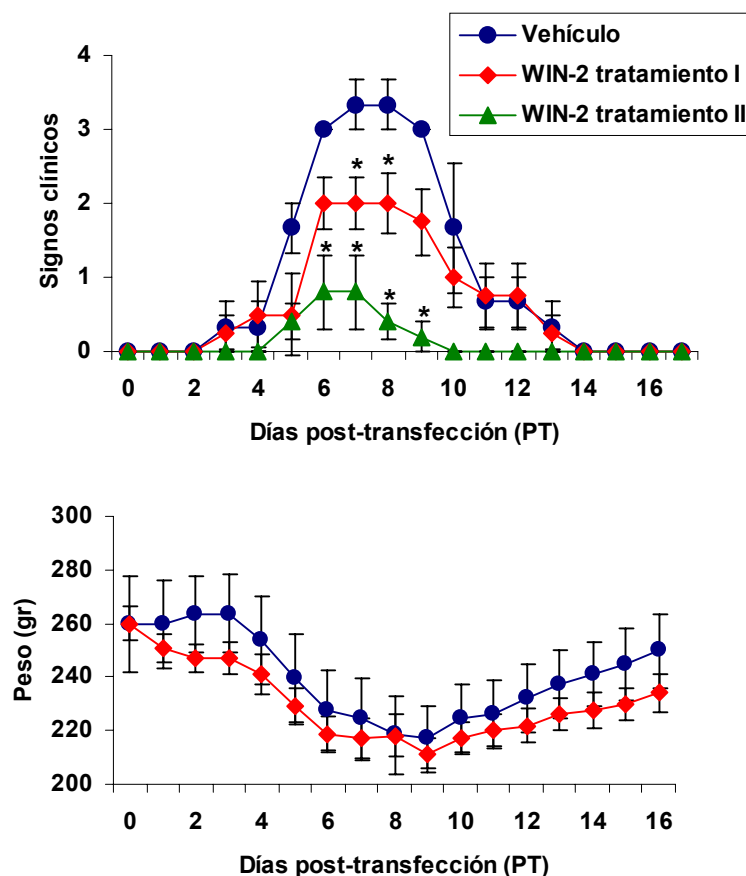
### 3.2. Efecto en las manifestaciones clínicas de la EAE pasiva

En este estudio se utilizaron ratas Lewis macho inmunizadas con  $20 \times 10^6$  células obtenidas de ganglios linfáticos de animales inmunizados de forma activa a 10PI como se ha descrito en materiales y métodos. Los animales se dividieron en 2 grupos tratados con WIN-2 (**Figura 8**).

En los animales control, tratados con el vehículo, la enfermedad se desarrolló de forma aguda monofásica tal y como se ha descrito anteriormente (**Figura 4**).

En el grupo de animales tratados con WIN-2 tratamiento I indujo una enfermedad menos agresiva, obteniendo diferencias significativas en los días 7 y 8 PT. El tratamiento II con WIN-2 retrasó la aparición de los primeros signos clínicos, que fueron detectados dos días más tarde que en el grupo control y desaparecieron antes que el grupo tratado con el vehículo. Con el

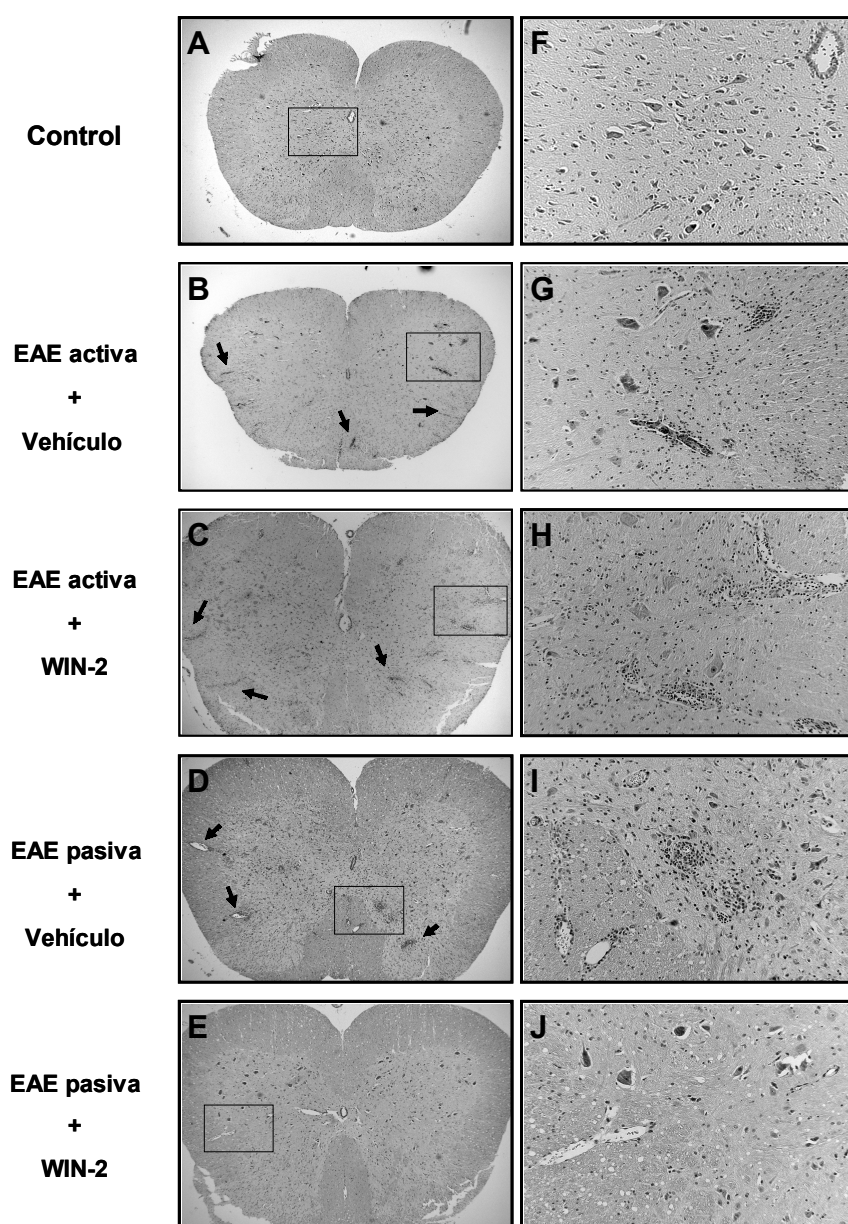
tratamiento II en el que se aumentó diariamente la dosis administrada para evitar posible desensibilización, se redujeron aún más los signos clínicos de los animales encontrando diferencias significativas en los días 6 a 9 PT respecto al grupo control.



**Figura 8.** WIN-2 suprime los signos clínicos de la EAE inducida de forma pasiva. Cinco animales por grupo se trataron por vía intraperitoneal con una dosis diaria de WIN-2. **WIN-2 tratamiento I:** 2 mg/kg de día 0 a día 8 PT. **WIN-2 tratamiento II:** 4 mg/kg (días 0-2 PT), 4.5 mg/kg (día 3 PT), 5 mg/kg (día 4 PT), 5.5 mg/kg (día 5 PT), 6 mg/kg (día 6 PT), 6.5 mg/kg (día 7 PT), 7 mg/kg (día 8 PT). Los animales controles (**Vehículo**) fueron tratados en paralelo con un volumen equivalente de vehículo. Comparado con el grupo control, los tratamientos I y II redujeron significativamente los signos clínicos (\* $p < 0.05$ ; test no paramétrico de Mann-whitney) en los días 7-8 PT y 6-9 PT, respectivamente. Ninguno de los tratamientos tuvo efecto en la curva de peso. Los valores indican la media de los signos clínicos  $\pm$  error estándar de la media de cada día.

### 3.3. Estudio anatomopatológico del tratamiento con WIN-2 en la EAE activa y pasiva

Con la técnica de tinción con H&E, se pudo apreciar una gran infiltración celular en la médula espinal en las dos variedades de la EAE, así como en el grupo de animales de la EAE activa tratados con WIN-2. Sin embargo en el grupo de animales de la EAE pasiva tratados con WIN-2 hubo una reducción de los infiltrados inflamatorios en el día de máximo grado de la enfermedad (7PT). Es importante reseñar la clara correlación entre los signos clínicos de la enfermedad y el grado de infiltración celular en la médula espinal: ratas con grado 0 no mostraban infiltración mientras ratas con grado 3 ó 4 mostraban una gran infiltración celular en los cortes de médula espinal (**Figura 9**).



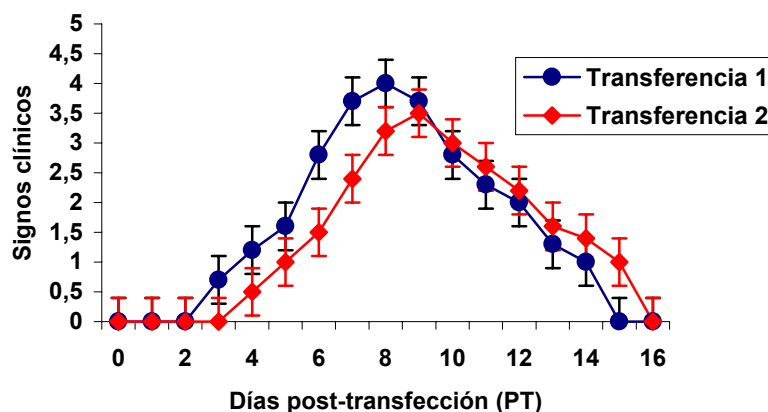
**Figura 9.** WIN-2 reduce de la infiltración celular en la médula espinal de la EAE pasiva. En el pico de los signos clínicos, 7 PT en la EAE pasiva y 13 PI en la EAE activa, se extrajeron las médulas espinales de los animales y se tiñeron con H&E. Comparado con el grupo **Control (A)**, las ratas con **EAE activa (B)** y **pasiva (D)** mostraban infiltración celular; esta inflamación seguía observándose en las médulas espinales de los animales con **EAE activa** tratados con **WIN-2 (C)**, pero en los animales con **EAE pasiva** tratados con **WIN-2** (tratamiento II de la figura 7) la tinción demuestra una clara reducción de la infiltración celular **(E)**. Zonas de **(A)-(E)** (2.5x) se muestran a mayor aumento (10x) en **(F)-(J)**, respectivamente. Las áreas de intensa infiltración celular se indican con flechas. Imágenes representativas de 5 animales por grupo.

#### 4. Capacidad encefalitogena del cultivo primario de células mononucleares

Para comprobar si las células extraídas de los animales con EAE y posteriormente cultivadas durante diferentes periodos de tiempo tenían capacidad encefalitogena se inyectaron diferentes cantidades de células por vía intravenosa en ratas Lewis sanas. Este hecho se comprobó en dos transferencias distintas a ratas singénicas sanas (**Figura 10**):

- **Transferencia 1** de células con 4 rondas de reestimulaciones consecutivas *in vitro*.
- **Transferencia 2** de células que provenían de un proceso de congelación /descongelación seguido de una tercera ronda de reestimulación *in vitro*.

Las células mononucleares cultivadas indujeron EAE al ser transferidas por vía intravenosa (transferencia pasiva de EAE), esto demostraba que las células usadas para los posteriores experimentos poseían capacidad encefalitógena.



**Figura 10.** Las células cultivadas demostraron tener una potente capacidad encefalitógena al ser inoculadas en animales sanos. La **Transferencia 1** se realiza con células con 4 rondas de reestimulación y la **Transferencia 2** con células congeladas que tras una descongelación se someten a una tercera ronda de activación. Cada transferencia se realizó en 4 ratas Lewis sanas.

## 5. Estudio de la apoptosis inducida por WIN-2 y otros cannabinoides en cultivo primario de células encefalitógenas

En la EAE, se ha podido confirmar que la recuperación de los signos clínicos se asocia con la eliminación, por apoptosis de las células inflamatorias (Dowling et al. 1997) presentes en el SNC (Pender & Rist 2001). A partir de un cultivo primario de células encefalitógenas reactivas a MBP se analizó por diferentes técnicas la apoptosis inducida por cannabinoides.

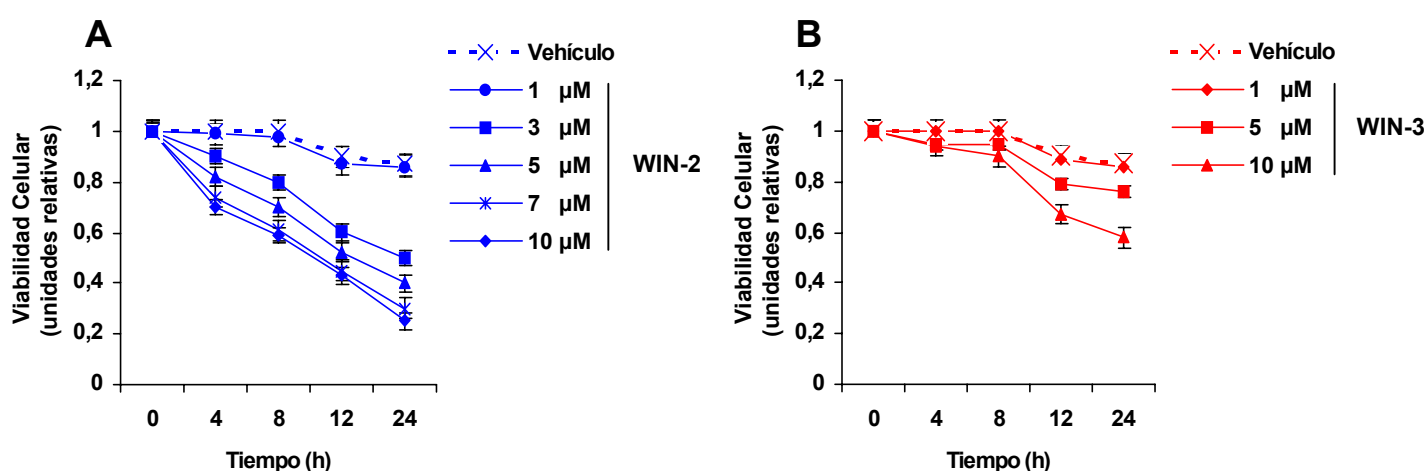
### 5.1. Viabilidad por MTT

En primer lugar se estudió la viabilidad celular mediante el ensayo MTT de las células encefalitógenas frente a concentraciones crecientes de WIN-2 y WIN-3. Como se puede observar en la **figura 11**, la viabilidad se redujo de forma dosis dependiente cuando las células se cultivaron en presencia de WIN-2 (**A**). Por el contrario, WIN-3, el enantiómero inactivo de WIN-2, indujo citotoxicidad a dosis mucho más altas, sugiriendo la implicación de receptores de

cannabinoides (**B**). Como las dosis de 7 y 10  $\mu\text{M}$  tenían una eficacia similar en la supervivencia celular se escogió la dosis de 7  $\mu\text{M}$  para las siguientes series de experimentos.

Uno de los problemas que se presenta a la hora de estudiar los cannabinoides es la dificultad para disolverlos, debido a su gran lipofilia y su baja solubilidad en agua. Esto obliga a utilizar vehículos no acuosos como etanol, DMSO, polivinilpirrolidona, Tween 80, cremophor, emulphor y albúmina sérica bovina (BSA). Por lo tanto, es indispensable hacer experimentos control con el vehículo para descartar efectos debidos a él.

En los experimentos se disolvieron los cannabinoides en DMSO, sustancia que se denominó vehículo y que se utilizó a la misma concentración que la correspondiente a la mayor dosis de WIN-2.

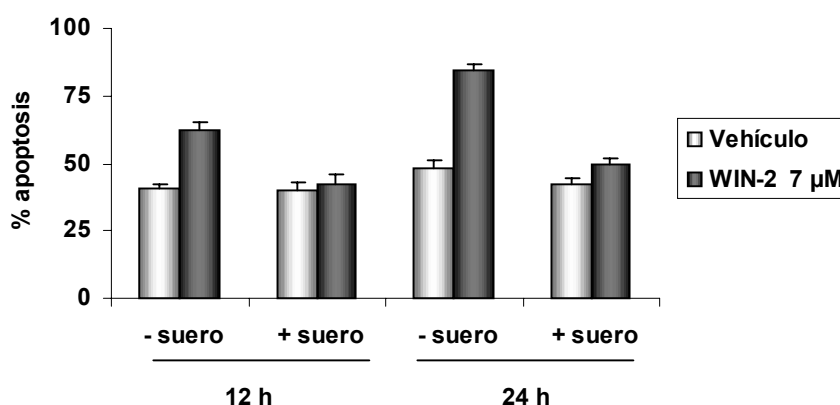


**Figura 11.** WIN-2 disminuye la viabilidad celular de las células encefalíticas. Efecto en la viabilidad celular medida por MTT de diferentes concentraciones de **WIN-2** (**A**) y **WIN-3** (**B**) a diferentes tiempos. Los resultados se expresan como valores relativos a las células tratadas con vehículo y corresponden a la media  $\pm$  error estándar de la media de tres experimentos independientes.

## 5.2. Efecto del suero

Un factor que puede interferir con la acción de los cannabinoides es la presencia de endocannabinoides (AEA y 2-AG) a una concentración relativamente alta en el plasma (Giufrida et al. 2000) y en los sueros bovinos fetales comerciales (Berdyshev 2000), lo que implica que las células circulantes del sistema inmune y las células en cultivo están constantemente expuestas a endocannabinoides. Esto puede explicar el hecho de que bajas concentraciones de cannabinoides exógenos no tengan efecto al medir ciertos parámetros en la respuesta inmune, *in vivo* o *in vitro*, cuando los experimentos se realizan en presencia de altas concentraciones de suero en el medio. Estudios previos sugerían que la eficacia de

algunos cannabinoides como el  $\Delta^9$ -THC podía estar relacionada con la concentración de suero (Jacobsson et al. 2000). Por lo tanto se examinó mediante citometría de flujo el efecto del suero en la inducción de apoptosis. En la **figura 12** se observa cómo en un medio desprovisto de suero el tiempo requerido para inducir apoptosis es menor que en un medio suplementado. Ya que el suero tenía una influencia en la inducción de apoptosis por WIN-2 todos los experimentos subsiguientes se realizaron en medio carente de suero.

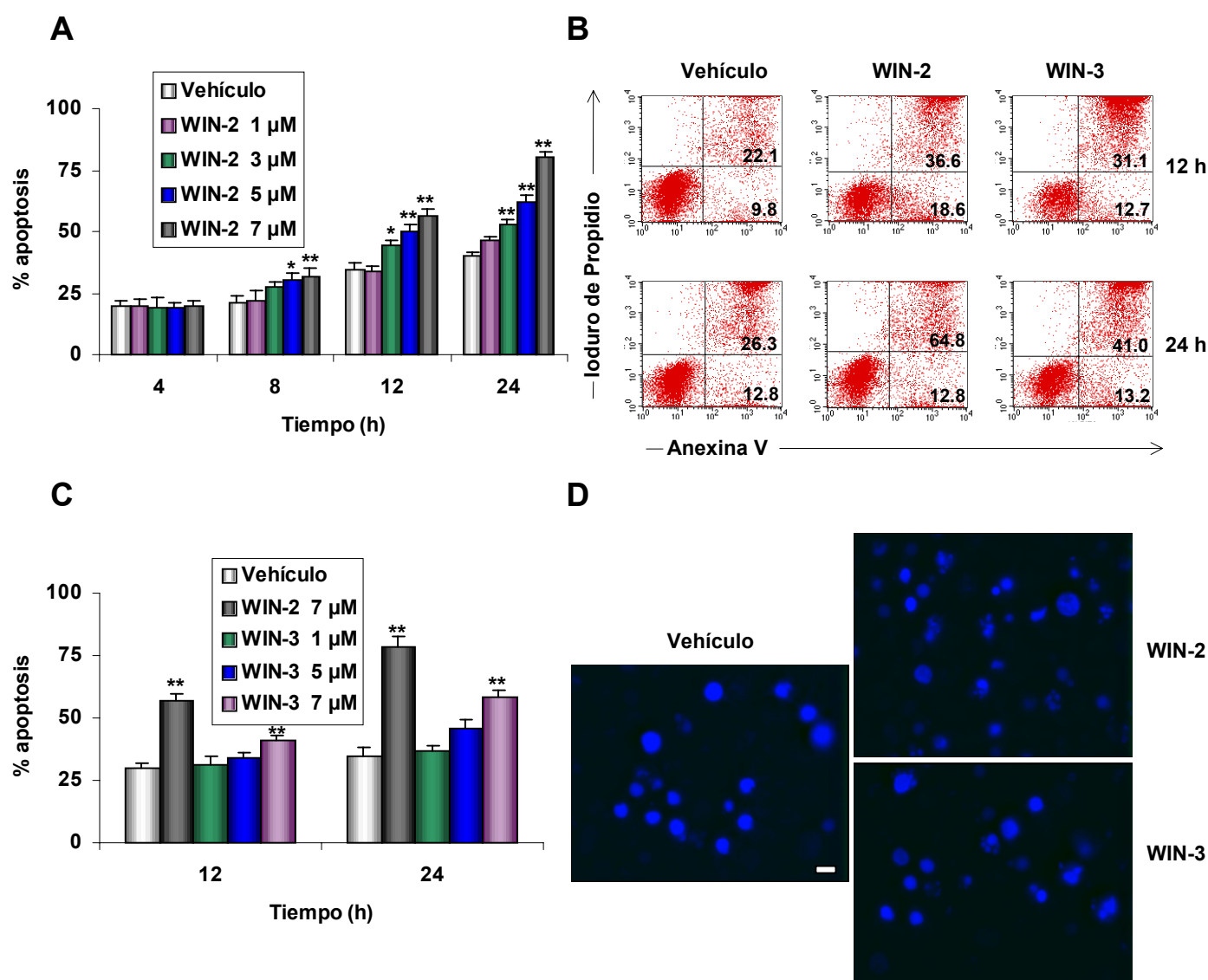


**Figura 12.** El suero influye en la inducción de apoptosis. WIN-2 a una concentración de 7  $\mu$ M es más eficaz en la inducción de apoptosis en un medio libre de suero (- suero) que un medio suplementado con suero (+ suero) tanto a 12 como a 24 horas. La apoptosis se determinó y cuantificó por el porcentaje de células Anexina-V/Ioduro de propidio positivas. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de la media de dos experimentos independientes.

### 5.3. Citometría de flujo y DAPI

Para valorar si esta reducción en la viabilidad era debida a apoptosis, las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de WIN-2 a diferentes tiempos, teñidas con Anexina V-FITC y ioduro de propidio, y medidas por citometría de flujo. En la **figura 13** se observa cómo la apoptosis comienza a inducirse a las 8 horas y a una concentración de 5  $\mu$ M (**A**). Con el uso de WIN-3 a las mismas concentraciones se observa un efecto mucho menor (**C**). Un análisis morfológico tras la tinción con DAPI (**D**), marcador de cambios morfológicos del núcleo, reveló núcleos condensados y fragmentados en las células tratadas con WIN-2, cambios que se encontraron de una forma minoritaria en las células tratadas con WIN-3. Estos efectos moderados de WIN-3 en la viabilidad y en la apoptosis indicaban que parte de la acción observada en estas células era estereo-selectiva.

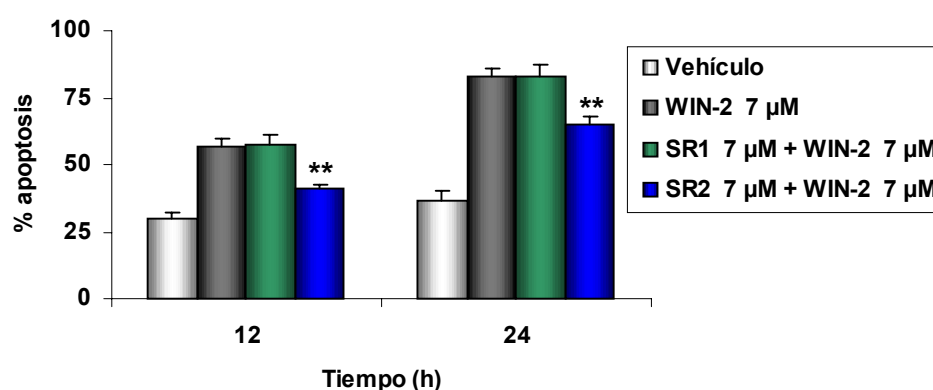




**Figura 13.** WIN-2 induce apoptosis en las células encefalitogénas. **(A)** La apoptosis se determinó y cuantificó por el porcentaje de células Annexina-V/Ioduro de propidio positivas, observándose un incremento con el tiempo (4, 8, 12 y 24 horas) y la concentración (1, 3, 5 y 7  $\mu$ M) de **WIN-2** al compararlo con las células tratadas con vehículo (DMSO). **(B)** Gráficos de puntos que representan el marcaje con Annexina-V/Ioduro de propidio de células tratadas con **WIN-2** y **WIN-3**. Se indica en cada cuadrante el porcentaje de células marcadas. **(C)** Cuantificación del efecto apoptótico de diferentes concentraciones (1, 5 y 7  $\mu$ M) de **WIN-3** al compararlo con 7  $\mu$ M de **WIN-2** a 12 y 24 horas. **(D)** La tinción con DAPI demuestra la mayor condensación del ADN en las células tratadas con 7  $\mu$ M de **WIN-2** con respecto a 7  $\mu$ M de **WIN-3** a las 12 horas. Barra = 10  $\mu$ m. Las diferencias al comparar con el vehículo fueron significativas (\* $p$  < 0.01 y \*\*  $p$  < 0.001) se evaluaron mediante ANOVA, seguido del test de Dunnett para comparaciones múltiples. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de la media de tres experimentos independientes.

#### 5.4. Antagonistas SR1 y SR2

Para averiguar si la apoptosis inducida por WIN-2 en las células encefalitógenas estaba mediada por los receptores de cannabinoides CB<sub>1</sub> y/o CB<sub>2</sub> usamos los antagonistas selectivos, SR1 (antagonista del receptor CB<sub>1</sub>) y SR2 (antagonista del receptor CB<sub>2</sub>). Las células se preincubaron en presencia o ausencia de SR1 o SR2 a la misma concentración que WIN-2 o vehículo y se analizaron por citometría de flujo. En la **figura 14** se puede observar cómo SR2 antagoniza parcialmente la apoptosis inducida por WIN-2, mientras que con SR1 no se revierte el efecto apoptótico. Estos resultados implican de forma parcial al receptor CB<sub>2</sub> en el proceso de inducción de apoptosis con WIN-2.

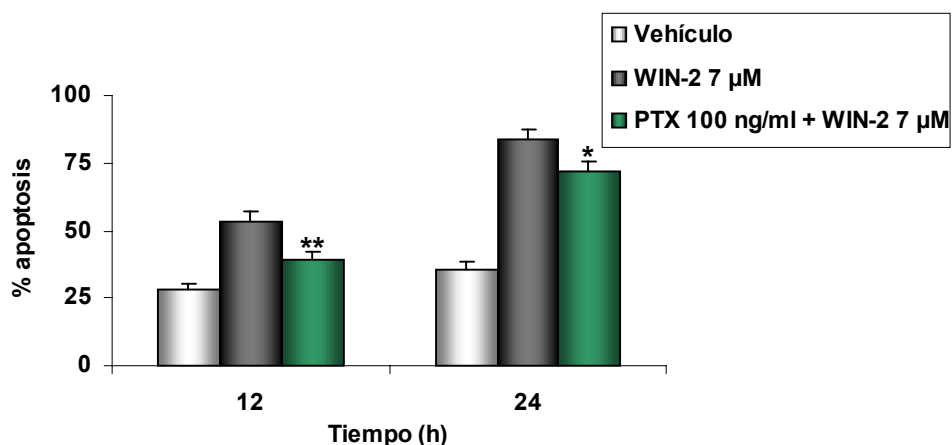


**Figura 14.** Participación de los receptores de cannabinoides en la inducción de apoptosis por WIN-2. Las células se preincubaron con los antagonistas **SR1** y **SR2** a una concentración de 7 μM durante 1 hora antes de tratarlas con **WIN-2** 7 μM o vehículo. SR2 revertía parte del efecto proapoptótico de WIN-2. La apoptosis se determinó y cuantificó por el porcentaje de células Anexina-V/Ioduro de propidio positivas. Las diferencias de los antagonistas respecto a WIN-2 7 μM resultaron significativas (\*\*p < 0.001) tras análisis mediante ANOVA, seguido del test de Dunnett para comparaciones múltiples. Los valores representan la media ± error estándar de la media de tres experimentos independientes.

#### 5.5. Toxina Pertussis

Como ya se comentó, los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> están funcionalmente acoplados a través de proteínas G heterotriméricas. La preincubación de las células con toxina pertussis (PTX), que bloquea la disociación de proteínas Gi/Go, inhibía parcialmente la inducción de apoptosis, indicando que el efecto de WIN-2 era, al menos en parte, mediado por un receptor acoplado a proteína Gi (**Figura 15**). El hecho de que ni con el antagonista SR2 ni con la toxina se inhibiese totalmente la acción apoptótica de WIN-2, implica la contribución de un componente independiente de receptor.

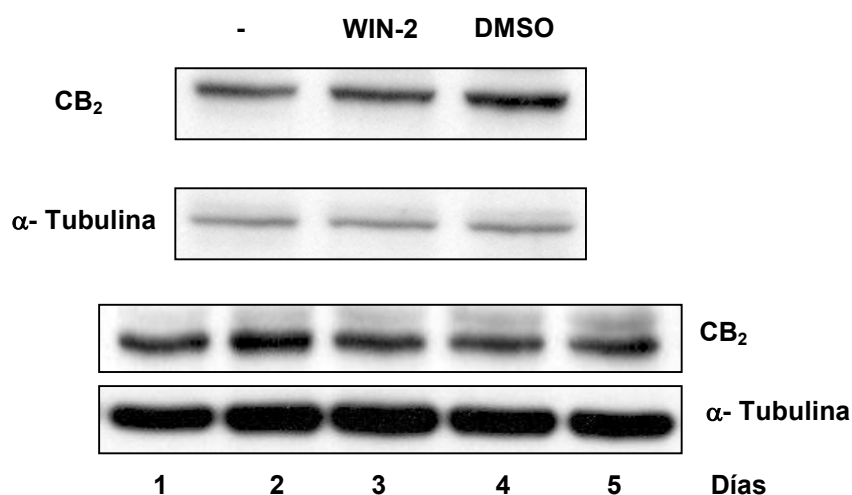




**Figura 15.** Participación de los receptores acoplados a proteínas G en la inducción de apoptosis por WIN-2. La preincubación con **PTX** a 100 ng/ml durante 3 horas prevenía parte de la apoptosis inducida con **WIN-2** 7µM. La apoptosis se determinó y cuantificó por el porcentaje de células Anexina-V/Ioduro de propidio positivas. Las diferencias resultaron significativas al comparar con WIN-2 7 µM (\* $p < 0.01$  y \*\* $p < 0.001$ ) y se calcularon mediante ANOVA, seguido del test de Dunnett para comparaciones múltiples. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de la media de tres experimentos independientes.

## 5.6. Expresión de CB<sub>2</sub>

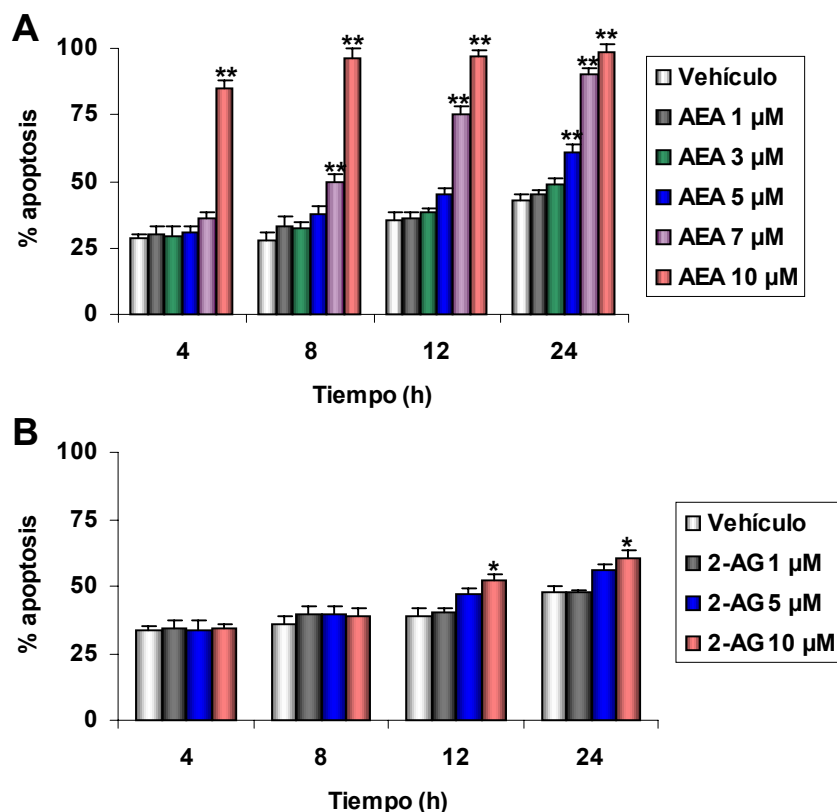
La expresión del receptor CB<sub>2</sub> en estas células se estudió por la técnica de Western blot usando el anticuerpo Cb2 Receptor Polyclonal que detecta una proteína de 45 kDa. Como se observa en la **figura 16**, no se modificó la expresión del receptor CB<sub>2</sub> de las células encefalitógenas a lo largo del tiempo de cultivo ni con la adición de WIN-2.



**Figura 16.** Expresión del receptor **CB<sub>2</sub>** en células encefalitógenas T (CET) por western blot. No se observan cambios significativos en los niveles de expresión tras 12 h de incubación con **WIN-2** 7 µM o vehículo (**DMSO**) ni tras 5 días de cultivo consecutivos. Como control de carga se empleó un anticuerpo anti  $\alpha$ -Tubulina.

### 5.7. Inducción de apoptosis con otros cannabinoides: endocannabinoides

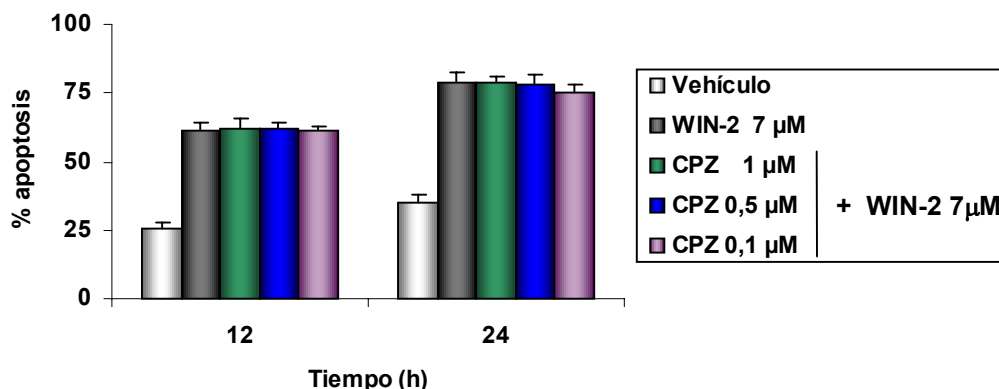
Se estudió el efecto de los dos cannabinoides endógenos más importantes, AEA y 2-AG, sobre la apoptosis en células encefalíticas. Se comprobó el efecto proapoptótico, por citometría de flujo, tanto de AEA y 2-AG, de una forma dosis-dependiente, si bien el de AEA era mucho más potente que el de 2-AG (**Figura 17**).



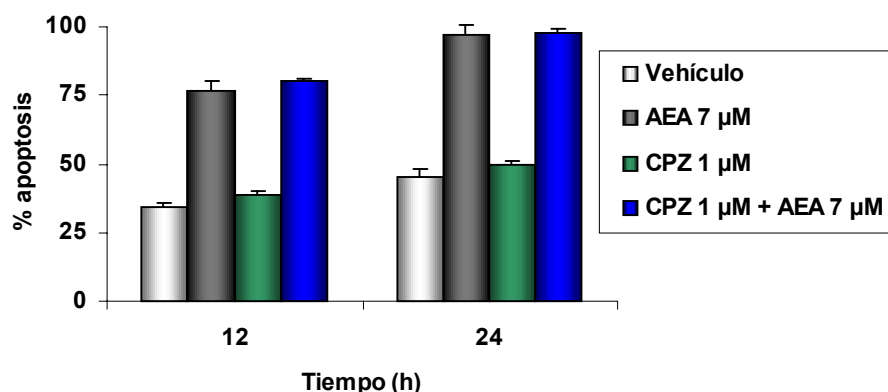
**Figura 17.** AEA y 2-AG inducen apoptosis en las células encefalíticas de forma dosis dependiente. **(A)** Inducción de apoptosis con diferentes concentraciones (1, 3, 5, 7 y 10 µM) de AEA a diferentes tiempos (4, 8, 12 y 24 horas). **(B)** Inducción de apoptosis con diferentes concentraciones (1, 5 y 10 µM) de 2-AG a diferentes tiempos (4, 8, 12 y 24 horas). La significación estadística respecto al vehículo (\* $p < 0.01$  y \*\*  $p < 0.001$ ) se calculó mediante ANOVA, seguido del test de Dunnett para comparaciones múltiples. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de la media de tres experimentos independientes.

### 5.8. Receptores de vanilloides

Los receptores vanilloides han sido estudiados por su implicación en efectos mediados por cannabinoides, como por ejemplo la anandamida que también se comporta como un agonista vanilloide. Una vez estudiado el efecto proapoptótico de WIN-2 sobre estas células y demostrada la implicación parcial del receptor de cannabinoides CB<sub>2</sub>, se estudió si el posible efecto apoptótico no inhibido por el bloqueo de los receptores de cannabinoides podía estar mediado por los receptores de vanilloides. Para tal fin, se utilizó capsazepina (CPZ), el mayor antagonista competitivo del receptor VR1. Como se observa en la **figura 18** la preincubación con este antagonista no hizo revertir la apoptosis inducida por WIN-2. Tampoco se observó reducción de la apoptosis inducida por AEA al preincubar las células con CPZ (**Figura 19**).



**Figura 18.** Participación de los receptores vanilloides en la inducción de apoptosis por WIN-2. Las células se preincubaron con diferentes concentraciones (1, 0.5 y 0.1  $\mu$ M) del antagonista **CPZ** durante 1 hora antes de tratarlas con **WIN-2** 7 $\mu$ M o **vehículo**. CPZ no revertía el efecto proapoptótico de WIN-2. La apoptosis se determinó y cuantificó por el porcentaje de células Anexina-V/Ioduro de propidio positivas. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de la media de tres experimentos independientes.



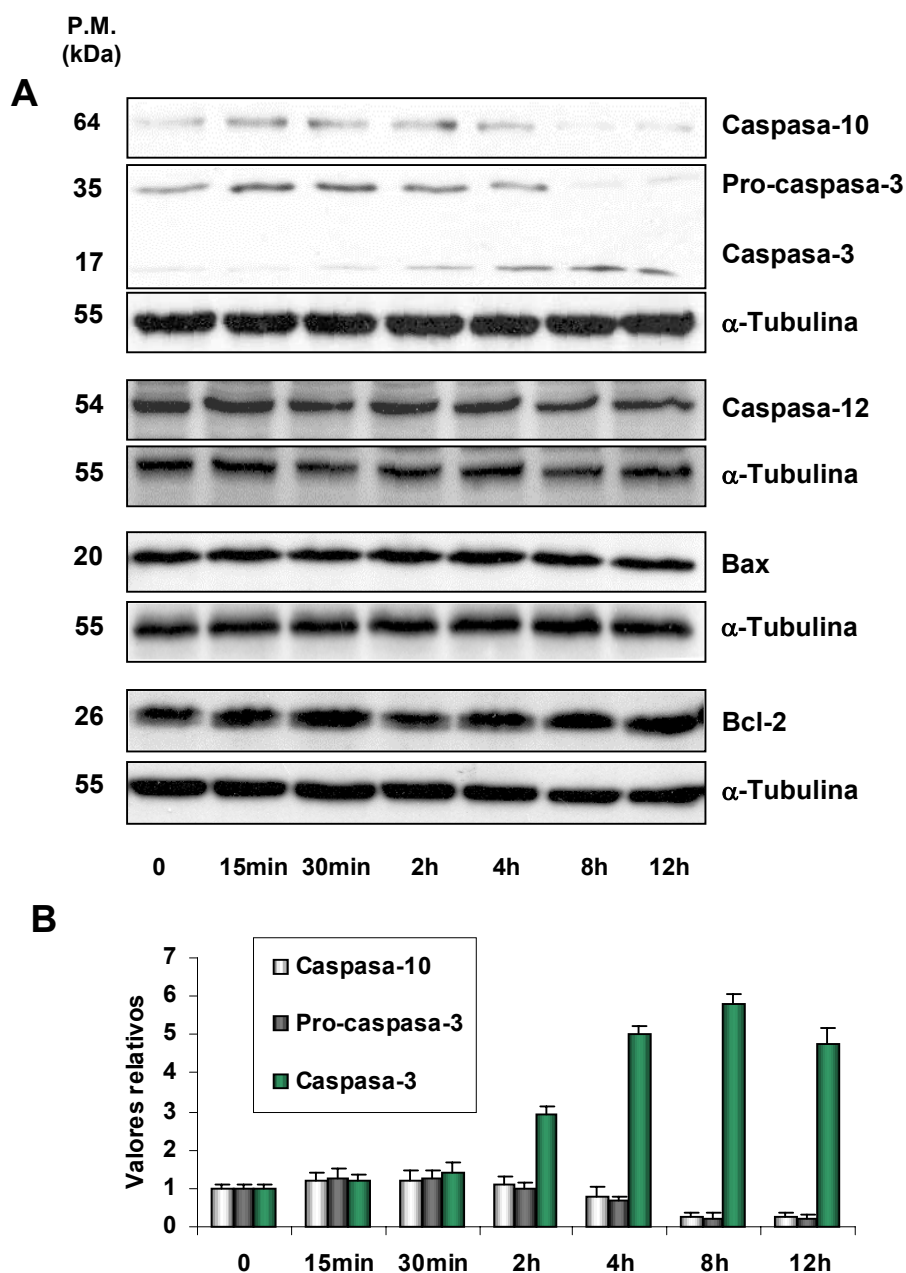
**Figura 19.** Participación de los receptores vanilloides en la inducción de apoptosis por AEA. Las células se preincubaron con 1  $\mu$ M del antagonista **CPZ** durante 1 hora antes de tratarlas con **AEA** 7 $\mu$ M o **vehículo**. CPZ no revertía el efecto proapoptótico de la AEA. La apoptosis se determinó y cuantificó por el porcentaje de células Anexina-V/Ioduro de propidio positivas. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de la media de tres experimentos independientes.

### 5.9. Estudio de proteínas implicadas en la inducción de apoptosis

Para ahondar en el mecanismo de inducción de apoptosis, se analizó por Western blot el estado de activación de ciertas proteínas implicadas en este proceso, como son caspasa-3, caspasa-10, caspasa-12, Bax y Bcl2. Como se puede observar en la **figura 20**, tras el tratamiento con WIN-2 se activaban las pro-caspasas-3 y -10, apareciendo secuencialmente la proteína proteolizada de 17-kDa (caspasa-3) y desapareciendo la forma entera de la caspasa-

10, respectivamente. Otra caspasa implicada en la apoptosis, la caspasa-12 que se activa por estrés del retículo endoplásmico, no se modificó tras tratar las células con WIN-2. Tampoco parecían estar implicadas las proteínas Bax (proapoptótica) y Bcl-2 (antiapoptótica) relacionadas con la ruta extrínseca de la apoptosis, ya que no se vieron afectadas tras el tratamiento con WIN-2. No se observó activación de caspasa-3 ni de caspasa-10 con el enantiómero inactivo WIN-3.

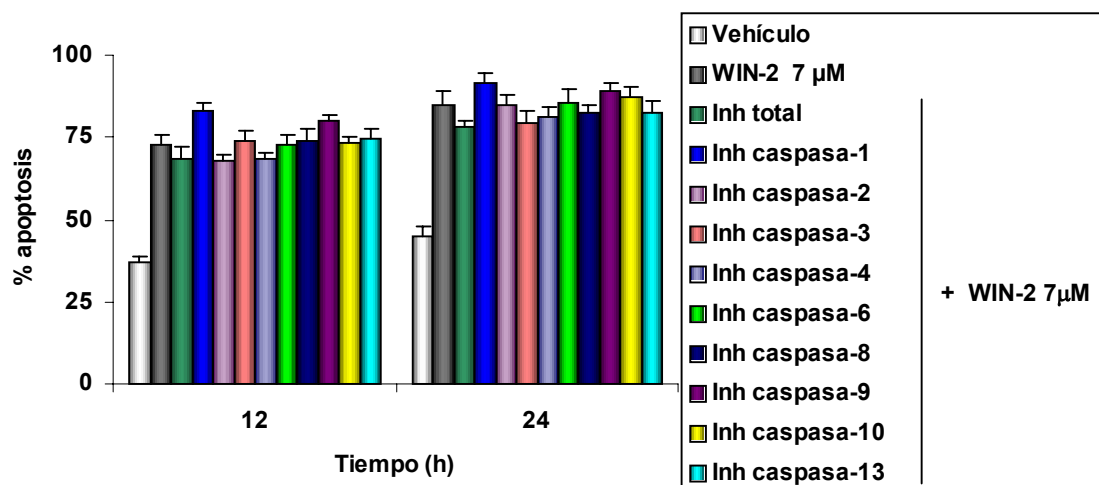
Incubaciones con el vehículo (DMSO) a los tiempos más largos del estudio no mostraron modificaciones de ninguna de las proteínas analizadas.



**Figura .** Análisis por Western Blot de las proteínas implicadas en la apoptosis inducida por WIN-2 7  $\mu$ M a los tiempos indicados. **(A)** Se muestra una disminución de la forma entera de la **caspasa-10** (64 kDa) y de la **pro-caspasa-3** (35 kDa) y el correspondiente aumento de la **caspasa-3** (17 kDa). Otras proteínas como **caspasa-12** (54 kDa), **Bax** (20 kDa) y **Bcl-2** (26 kDa) no parecen estar asociadas a la inducción de apoptosis por WIN-2. El control de carga se realizó usando un anticuerpo anti  $\alpha$ -**Tubulina** (55 kDa). Los pesos moleculares (P.M.) en kDa de cada proteína se dan a la izquierda. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes. **(B)** Los niveles relativos de **caspasa-10** y de la forma entera y proteolizada de **caspasa-3** se cuantificaron mediante análisis densitométrico que se normalizó con la  $\alpha$ -**Tubulina**. Los valores relativos al control representan la media  $\pm$  error estándar de la media de tres experimentos independientes.

### 5.10. Inhibidores de caspasas

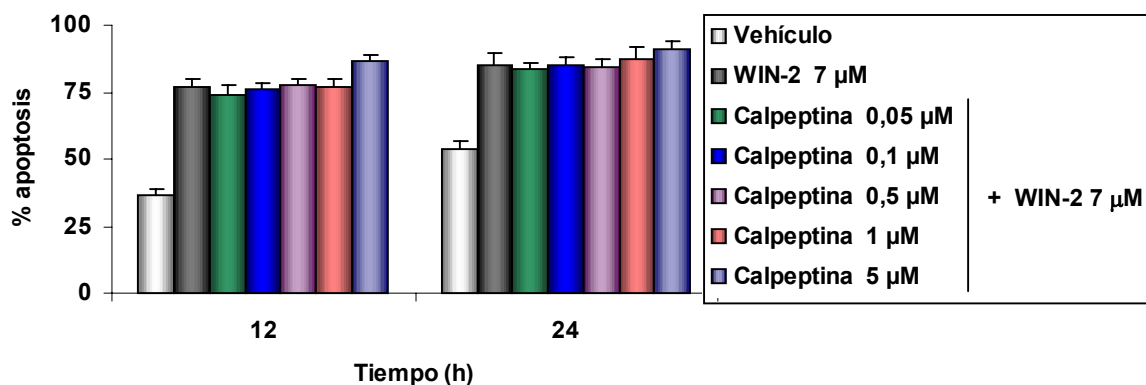
Ya que WIN-2 inducía muerte celular asociada a activación de caspasa-3 y caspasa-10, se examinó si ciertos inhibidores de caspasas (R&D System) eran capaces de modificar dicha inducción. Sorprendentemente, el pretratamiento tanto con un inhibidor total como con específicos de caspasas no tuvo efecto en la inducción de apoptosis por WIN-2 en las condiciones estudiadas (**Figura 21**).



**Figura 21.** Participación de las caspasas en la inducción de apoptosis por WIN-2. Las células se preincubaron con un inhibidor total de caspasas (Inh total) y con diferentes inhibidores específicos (Inh caspasa-1, -2, -3, -4, -6, -8, -9, -10, -13) a una concentración de 10  $\mu$ M durante 3 horas antes de tratarlas con WIN-2 7 $\mu$ M o vehículo. Los inhibidores de caspasas no revertían el efecto proapoptótico de WIN-2. La apoptosis se determinó y cuantificó por el porcentaje de células Anexina-V/Ioduro de propidio positivas. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de la media de tres experimentos independientes.

### 5.11. Inhibidores de calpaínas

Tras realizar los experimentos con inhibidores de caspasas y observar que no había reversión del efecto apoptótico de WIN-2 se llevaron a cabo estudios con inhibidores de calpaínas ya que trabajos previos de otros autores, en los que se observaba activación de caspasas e ineficacia de inhibidores de caspasas tras el tratamiento con cannabinoides, describieron la implicación de las calpaínas en la apoptosis. El uso de calpeptina (Calbiochem, San Diego, CA), uno de los inhibidores específicos de calpaínas más usados, tampoco revirtió el efecto apoptótico de WIN-2 (**Figura 22**).

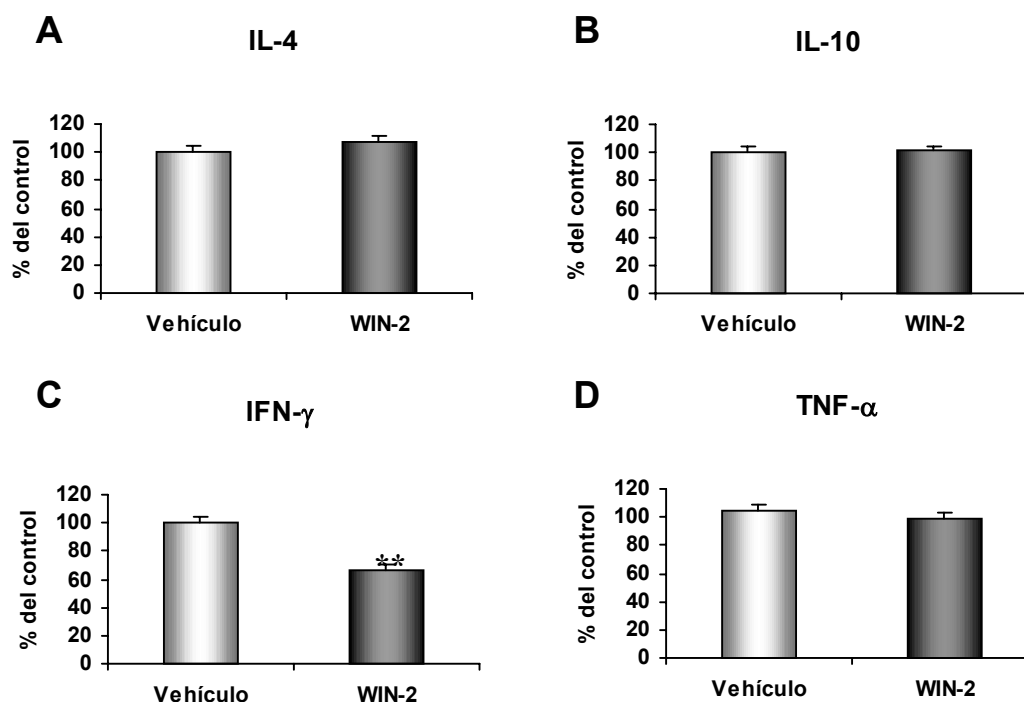


**Figura 22.** Participación de las calpaínas en la inducción de apoptosis por WIN-2. Las células se preincubaron con **calpeptina** a diferentes concentraciones (0.005, 0.1, 0.5, 1 y 5 µM) durante 3 hora antes de tratarlas con **WIN-2** 7µM o vehículo. La calpeptina no revertía el efecto proapoptótico de WIN-2. La apoptosis se determinó y cuantificó por el porcentaje de células Anexina-V/Ioduro de propidio positivas. Los valores representan la media ± error estándar de la media de tres experimentos independientes.

## 6. Estudio del efecto de WIN-2 sobre la producción de citocinas pro/antiinflamatorias en cultivo primario de células encefalitógenas

Como ya se ha mencionado anteriormente, la EAE es una enfermedad mediada por células T de tipo Th1 productoras de citocinas proinflamatorias. Hay un gran número de evidencias científicas que demuestran la modulación de citocinas por cannabinoides. En estudios recientes se ha demostrado cómo los cannabinoides pueden reducir en células Th1 la producción de citocinas como la IL-2, el IFN-γ o el TNF-α, o aumentar la producción, en células T cooperadoras tipo 2 (Th2), la producción de citocinas antiinflamatorias como la IL-4 y la IL-10 (Klein et al. 2000).

Para comprobar que WIN-2 modulaba la producción de citocinas en las células encefalitógenas se activaron éstas con PMA/Ionomicina, incubándolas con diferentes concentraciones de WIN-2 y se midió la producción intracelular de TNF-α, IFN-γ, IL-4 e IL-10 por citometría de flujo. En la **figura 23** se observa que WIN-2 disminuía la expresión de IFN-γ sin modificar la de TNF-α y cómo había un ligero aumento en la producción de IL-10 y ninguna diferencia en IL-4 respecto a los controles.



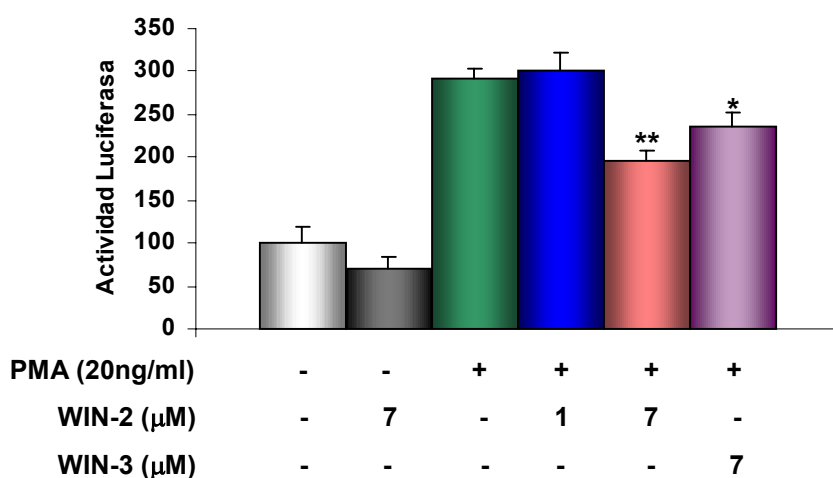
**Figura 23.** Efecto de WIN-2 sobre la producción de citocinas intracelulares. Las células se estimularon con PMA (0,1  $\mu$ g/ml) y ionomicina (1  $\mu$ g/ml) en presencia de 7  $\mu$ M de **WIN-2** o de **vehículo** (DMSO) durante 4 horas. Durante las últimas 3 h de cultivo se añadió brefeldina A (10  $\mu$ g/ml) para evitar la secreción de citocinas. Tras 4 horas, las células se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con los diferentes anticuerpos marcados con fluorocromos **(A) anti-IL-4**, **(B) anti-IL-10**, **(C) anti-IFN- $\gamma$**  y **(D) anti-TNF- $\alpha$** . WIN-2 disminuyó la producción de IFN- $\gamma$  y aumentó ligeramente la de IL-4. La adquisición de las muestras se realizó en un citómetro de flujo FACSsort con el programa informático “CELLQuest” y el análisis de los datos con el programa “Paint-a-gate Pro”. Los gráficos representan la media de cambios  $\pm$  error estándar de la media respecto a los vehículos de tres experimentos independientes (\*\*  $p < 0.001$ ).

## 7. Estudio del efecto de WIN-2 sobre el factor de transcripción NF- $\kappa$ B

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B es vital para la regulación de muchos genes implicados en procesos inflamatorios, de diferenciación y de muerte celular (Baeuerle & Henkel 1994). Tiene un papel central en la inflamación a través de la regulación de genes que codifican citocinas pro-inflamatorias, moléculas de adhesión, quimiocinas y factores de crecimiento. Se ha demostrado que los cannabinoides inhiben la activación de NF- $\kappa$ B, factor cuya activación desempeña un papel fundamental en la patogénesis de la EAE (Pahan & Schmid 2000).

Con el propósito de estudiar el efecto de WIN-2 sobre el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, se transfectaron células Jurkat con un plasmido que contiene el sitio de unión de NF- $\kappa$ B del gen MMP-9. Las células se estimularon con PMA en presencia de diferentes concentraciones de WIN-2. Los resultados en la **figura 24** muestran un aumento de la activación de NF- $\kappa$ B tras la adición de PMA y la inhibición de la actividad luciferasa cuando se añadió WIN-2. Con WIN-3,

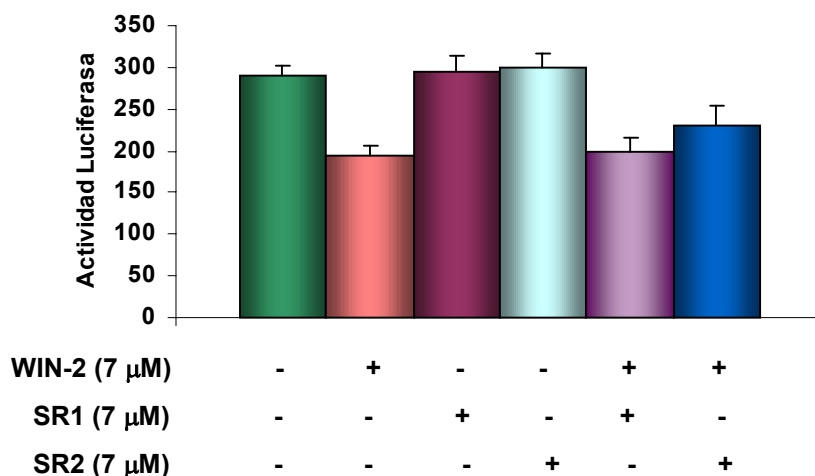
el enantiómero inactivo de WIN-2, el efecto inhibitorio de la actividad luciferasa fue menor, lo cual demuestra una cierta estereoselectividad en la acción.



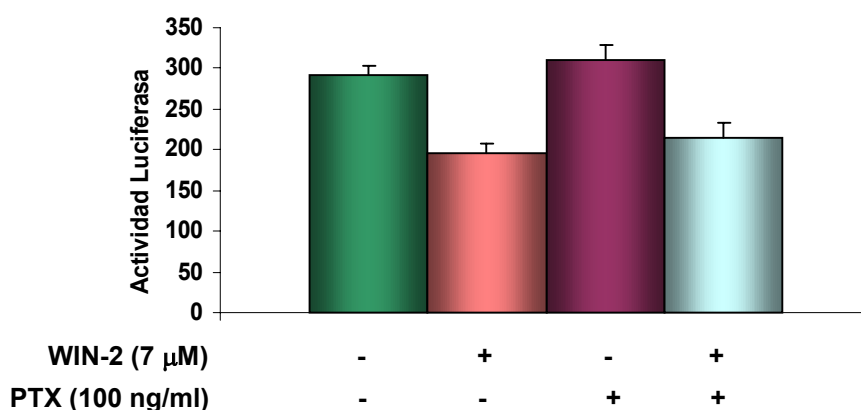
**Figura 24.** WIN-2 inhibe la actividad transcripcional de un plásmido que contiene el sitio de unión de NF- $\kappa$ B del gen MMP-9. Las células se transfectaron con la construcción que contenía un hexámero de la secuencia de unión a NF- $\kappa$ B ( $\kappa$ B- pGL3-prom) y se estimularon (+) o no (-) con **PMA** (20 ng/ml) durante 3 horas en presencia (+) o ausencia (-) de **WIN-2** a diferentes concentraciones (1 y 7  $\mu$ M) o **WIN-3** (7  $\mu$ M). La actividad transcripcional corresponde al valor de la actividad luciferasa normalizado por la actividad de la renina. Las diferencias resultaron significativas al comparar el estímulo con WIN-2 y WIN-3 7  $\mu$ M (\* $p$  < 0.01 y \*\* $p$  < 0.001) y se calcularon mediante ANOVA, seguido del test de Dunnett para comparaciones múltiples. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de la media de tres experimentos independientes.

El efecto inhibitorio en la activación de NF- $\kappa$ B por WIN-2 no parece implicar al receptor CB<sub>1</sub> resultado que se deduce de la preincubación con el antagonista SR1 (**Figura 25**). Por otro lado un pequeño efecto en la reversión de la inhibición de la activación al usar el antagonista SR2 indican una cierta participación del receptor CB<sub>2</sub> en estas células (**Figura 25**). Tampoco parecen estar implicados receptores ligados a proteínas G-toxina pertussis sensibles, al no tener efecto la PTX (**Figura 26**).



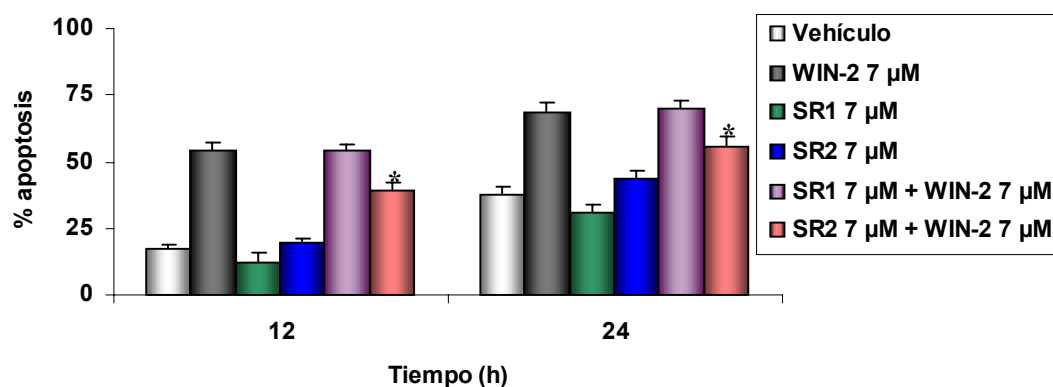


**Figura 25.** Participación parcial del receptor CB<sub>2</sub> en la inhibición de la actividad transcripcional por WIN-2. Las células Jurkat se transfectaron con la construcción que contenía un hexámero de la secuencia de unión a NF- $\kappa$ B ( $\kappa$ B- pGL3-prom), se preincubaron con **SR1** (7  $\mu$ M) o **SR2** (7  $\mu$ M) durante 1 hora y se estimularon con PMA (20 ng/ml) durante 3 horas en presencia (+) o ausencia (-) de **WIN-2** (7  $\mu$ M). La actividad transcripcional corresponde al valor de la actividad luciferasa normalizado por la actividad de la renilla. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de la media de cuatro medidas independientes.



**Figura 26.** Participación de los receptores acoplados a proteínas G en la inhibición de la actividad transcripcional por WIN-2. Las células Jurkat transfectadas, según se indica en la figura precedente, se preincubaron con **PTX** (100 ng/ml) durante 1 hora y se estimularon con PMA (20 ng/ml) durante 3 horas en presencia (+) o ausencia (-) de **WIN-2** (7  $\mu$ M). La actividad transcripcional corresponde al valor de la actividad luciferasa normalizado por la actividad de la renilla. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de la media de cuatro medidas independientes.

La apoptosis de estas células no se vio modificada a los tiempos en los que se hacían los estudios de actividad luciferasa mediada por NF- $\kappa$ B, sin embargo a tiempos más largos se volvió a observar un efecto proapoptótico de WIN-2 y el uso de los antagonistas SR1 y SR2 mostró una vez más la implicación del receptor CB<sub>2</sub> (**Figura 27**).



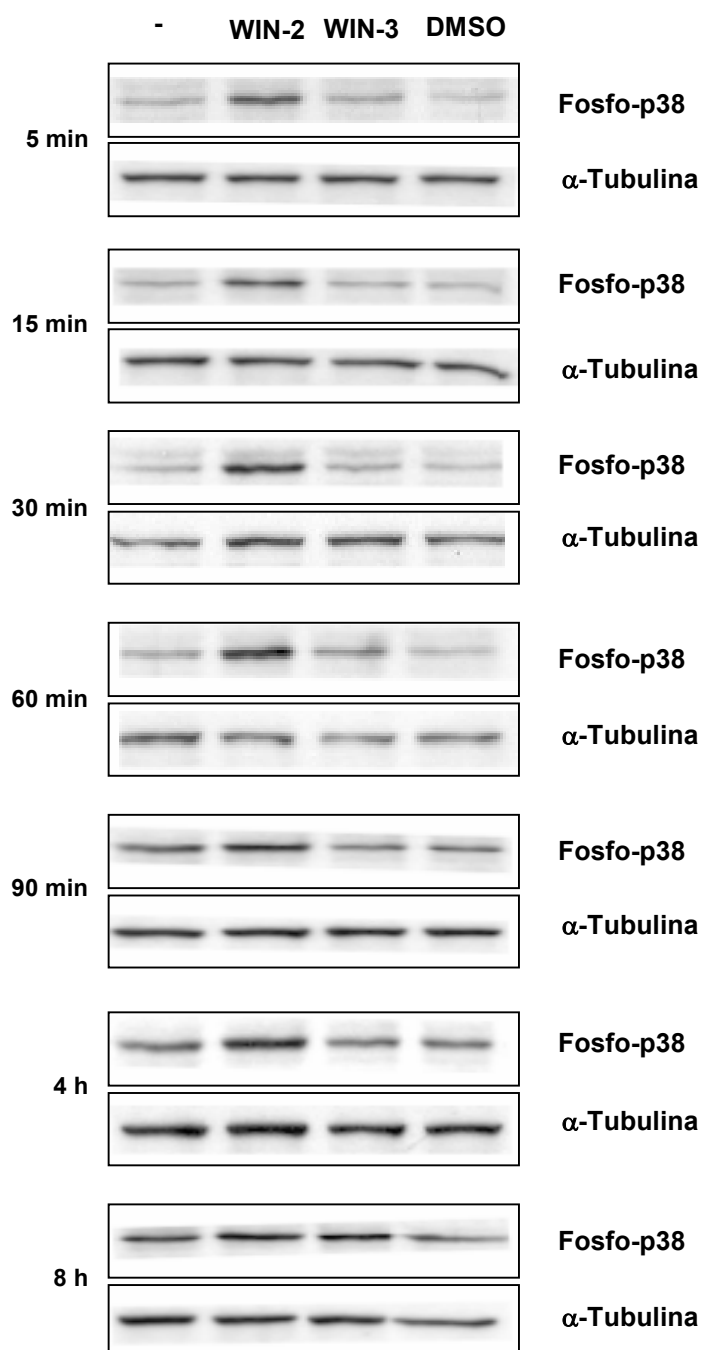
**Figura 27.** Implicación parcial de CB<sub>2</sub> en la inducción de apoptosis en células Jurkat por WIN-2. Las células se preincubaron con los antagonistas **SR1** y **SR2** a una concentración de 7  $\mu$ M durante 1 hora antes de tratarlas con **WIN-2** 7 $\mu$ M o el vehículo. SR2 revertía parte del efecto proapoptótico de WIN-2. La apoptosis se determinó y cuantificó por el porcentaje de células Anexina-V/Ioduro de propidio positivas. Las diferencias con respecto a WIN-2 7  $\mu$ M fueron significativas (\* $p$  < 0.01) y se evaluaron mediante ANOVA, seguido del test de Dunnett para comparaciones múltiples. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de la media de cuatro medidas independientes.

## 8. Estudio del efecto de WIN-2 sobre la vía p38 en cultivo primario de células encefalíticas

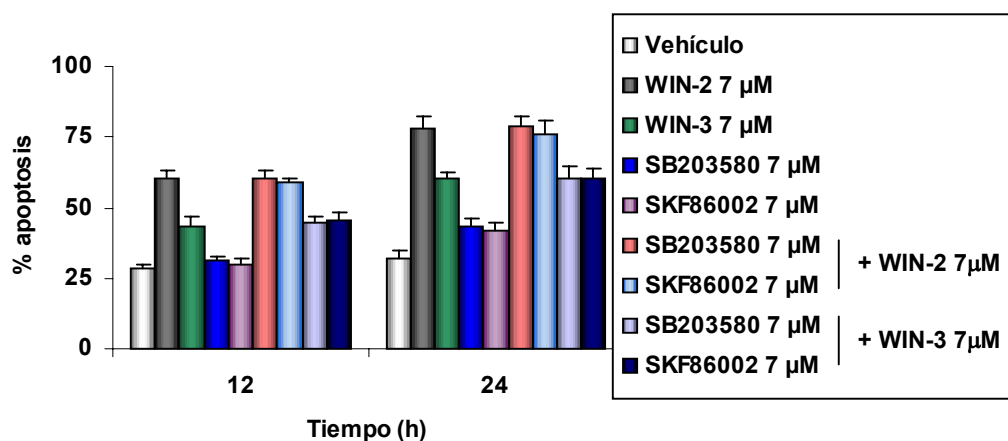
Desde la primera observación de la activación de la ruta MAPK por la AEA ([Wartmann et al. 1995](#)), extensos estudios moleculares y farmacológicos han demostrado que los cannabinoides regulan la cascada MAPK tanto *in vivo* como *in vitro*. En diferentes tipos celulares se ha observado cómo la estimulación del receptor CB<sub>2</sub> lleva a una activación de p38 ([Herrera et al. 2005](#)), una quinasa activada por señales de estrés y citocinas pro-inflamatorias que se asocia con muerte celular y alteraciones del sistema inmune ([Johnson & Lapadat 2002](#)). La inhibición de esta quinasa disminuye la activación de caspasas y la consiguiente inducción de apoptosis mediada por el receptor CB<sub>2</sub> en células de leucemia ([Herrera et al. 2005](#)).

Dada la implicación de la ruta MAPK en los efectos mediados por los cannabinoides se decidió estudiar los efectos de WIN-2 en la ruta de p38 y su posible implicación en la inducción de apoptosis en células encefalíticas. Mediante la técnica de Western Blot se midió la activación de p38 con un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de p38. A tiempos muy tempranos (desde los 5 minutos) se observó una activación de p38 con WIN-2 (**Figura 28**), activación que no se producía con WIN-3. Para ver la implicación de p38 en la inducción de apoptosis se preincubaron las células durante 1 hora con SB203580 y SKF86002, dos inhibidores específicos de p38, antes de añadir WIN-2 y WIN-3; los resultados mostraron que ninguno de los dos inhibidores eran capaces de evitar la apoptosis inducida por WIN-2 y por el enantiómero WIN-3 y medida por citometría de flujo (**Figura 29**). Tampoco se encontró reversión en la activación de las caspasas 3 y 10 a las 4 y 8 horas, al medir por Western blot

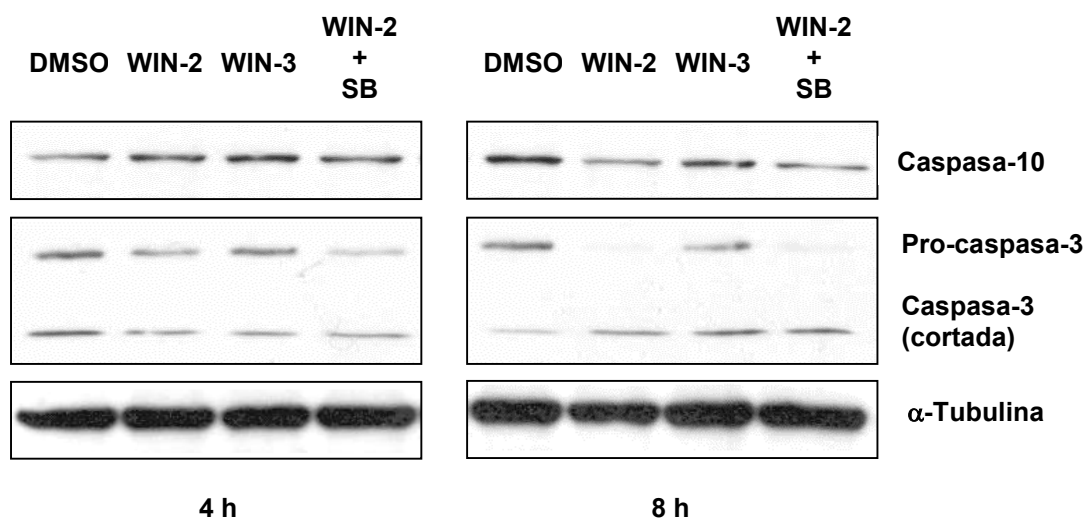
los extractos de cultivos tratados con WIN-2 y WIN-3 que habían sido preincubados 1 hora con SB203580 (**Figura 30**). La falta de eficacia de los inhibidores de p38 en la reversión de la apoptosis y la activación de las caspasas 3 y 10, implican que efectivamente hay una activación de p38 tras el uso de WIN-2, como han descrito otros autores, pero que no es necesaria para la inducción de apoptosis con este cannabinoide a esta concentración y en estas células.



**Figura 28.** Cambios en los niveles de Fosfo-p38 tras el tratamiento con WIN-2. Western blot de homogeneizados de células encefalíticas no tratadas (-) y tratadas con **WIN-2** 7 $\mu$ M, **WIN-3** 7 $\mu$ M y vehículo (**DMSO**) a diferentes tiempos (5, 15, 30, 60, 90 min, 4 y 8 h). Para detectar la forma fosforilada de p38 se utilizó un anticuerpo anti-**Fosfo-p38** y como control de carga se empleó un anticuerpo anti- $\alpha$ -**Tubulina**.



**Figura 29.** WIN-2 induce apoptosis en las células encefalitógenas independientemente de p38. La apoptosis se determinó y cuantificó por el porcentaje de células Anexina-V/Ioduro de propidio positivas. La preincubación de 1 hora con **SB203580** 7 μM y **SKF86002** 7 μM no revertía la apoptosis inducida por **WIN-2** y **WIN-3** a una concentración 7 μM a 12h y 24h. Los valores representan la media ± error estándar de la media de tres experimentos independientes.



**Figura 30.** Cambios en los niveles de Caspasa-3 y -10 tras el tratamiento con WIN-2. Western blot de homogeneizados de células encefalitógenas tratadas con vehículo (**DMSO**), **WIN-2** 7 μM, **WIN-3** 7 μM. La preincubación de 1 hora con **SB203580** 7 μM no consiguió revertir la activación por WIN-2 de la caspasa-3 ni -10 a 4 y 8 h. Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti-α-Tubulina.

## 9. Estudio de la expresión génica de CB<sub>2</sub> en el sistema inmunológico de enfermos de EM RR

Una vez realizados los estudios anteriormente descritos sobre el modelo animal de la esclerosis múltiple, observado el efecto de un cannabinoide exógeno, WIN-2, sobre ciertos aspecto de la células encefalitógenas (apoptosis, producción de citocinas, etc.) en los que participaba el receptor CB<sub>2</sub>, cuya presencia es mayor en las células del sistema inmunológico, se han iniciado en el laboratorio estudios de los niveles de expresión génica del receptor CB<sub>2</sub> en pacientes de EM RR.

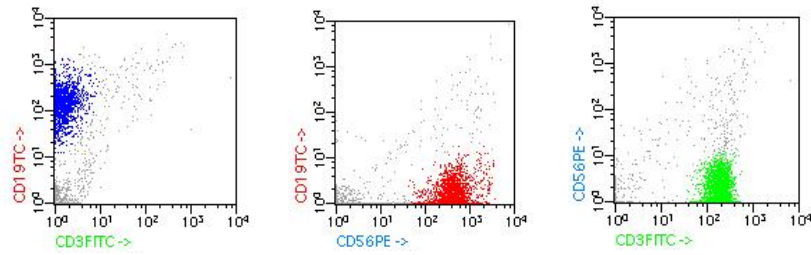
En la EM existen anomalías inmunológicas que incluyen una activación excesiva de células mononucleares que tienen un tránsito acelerado hacia el SNC donde producen una inflamación crónica y episódica que daña la mielina y los axones. El sistema cannabinoide está implicado en la regulación de la hiperactividad inmunológica y en la neuroprotección, y cabe la posibilidad de que los pacientes presenten anomalías en los niveles de expresión de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>.

Centrando el estudio en CB<sub>2</sub>, más presente en el sistema inmunitario, se han comparado mediante PCR cuantitativa los niveles de expresión génica del receptor CB<sub>2</sub> en células B, NK y T de la sangre periférica de individuos neurológicamente sanos con pacientes con EM RR activa y si existe variación en los niveles de expresión tras el tratamiento de algunos de estos pacientes con IFN- $\beta$ , una de las terapias más usadas en la EM.

Los individuos estudiados fueron 11 pacientes con EM RR diagnosticados según los criterios diagnósticos actualmente aceptados (Poser et al. 1983); (McDonald et al. 2001) a 6 de los cuales se les tomo una muestra tras 6 meses de tratamiento con IFN- $\beta$  (EM RR + 6 meses y 9 individuos sanos (controles). Los pacientes con EM RR fueron 9 mujeres y 2 hombres con edades comprendidas entre los 16 y 58 años (media 35 años) con media de 2,7 brotes en los últimos 3 años. Su valor de discapacidad en la escala EDSS (Expanded Disability Status Scale) inicial estuvo comprendido entre 0,0 y 6,0 (media 2,0).

En primer lugar, tras la extracción de sangre, se comprobó por citometría de flujo que el porcentaje obtenido de cada población celular (B, NK y T) en sangre periférica correspondía con el porcentaje teórico esperado. Así se obtuvo: 7 % de células B (5-10% teórico), 10 % de células NK (10-15% teórico) y un 80 % de células T (75-80 % teórico).

A continuación se separaron las diferentes poblaciones celulares a estudiar, células B, NK y T, por el método de RosetteSep® (Stem Cell Technologies Inc) y se comprobó, por citometría de flujo, la pureza de cada tipo celular separado. Los resultados obtenidos de varias muestras analizadas en cuanto a porcentaje de pureza fueron: para células B un 70%, para células NK un 77% y para células T un 90% (**Figura 31**). Es importante destacar que las poblaciones no estaban “contaminadas” con células de las otras poblaciones.

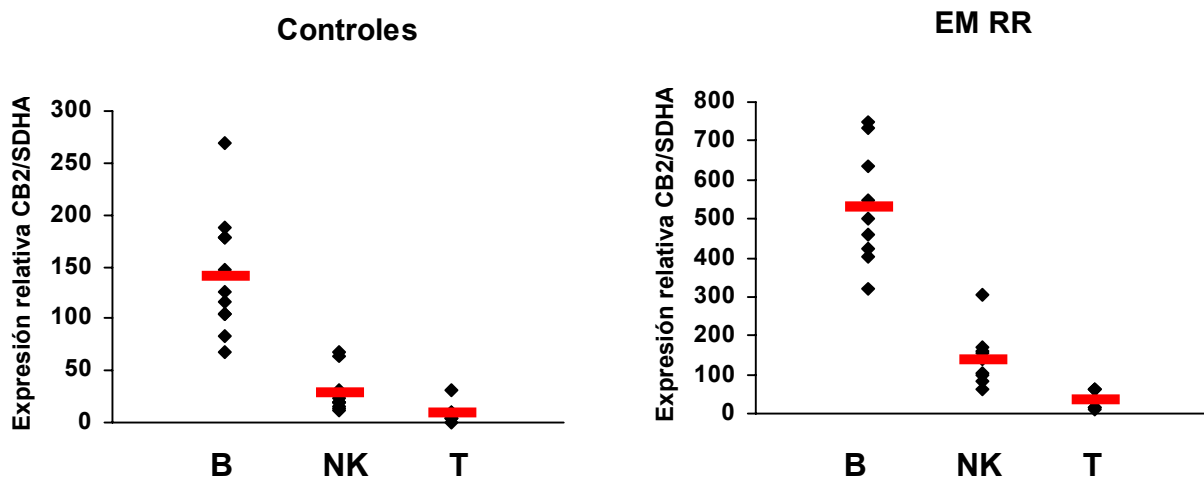


**Figura 31.** Gráficos de puntos representativo del marcaje con anti-CD19-TC para células **B** (panel izquierdo), con anti-CD56-PE para células **NK** (panel central) y con anti-CD3-FITC para células **T** (panel derecho).

Se realizó la extracción del ARN de las tres poblaciones de células separadas, se retrotranscribió a ADNc y se amplificó mediante una reacción de PCR a tiempo real el gen diana  $CB_2$  y el gen de referencia SDHA.

### 9.1. Tasa de expresión génica de $CB_2$ en células **B**, **NK** y **T**

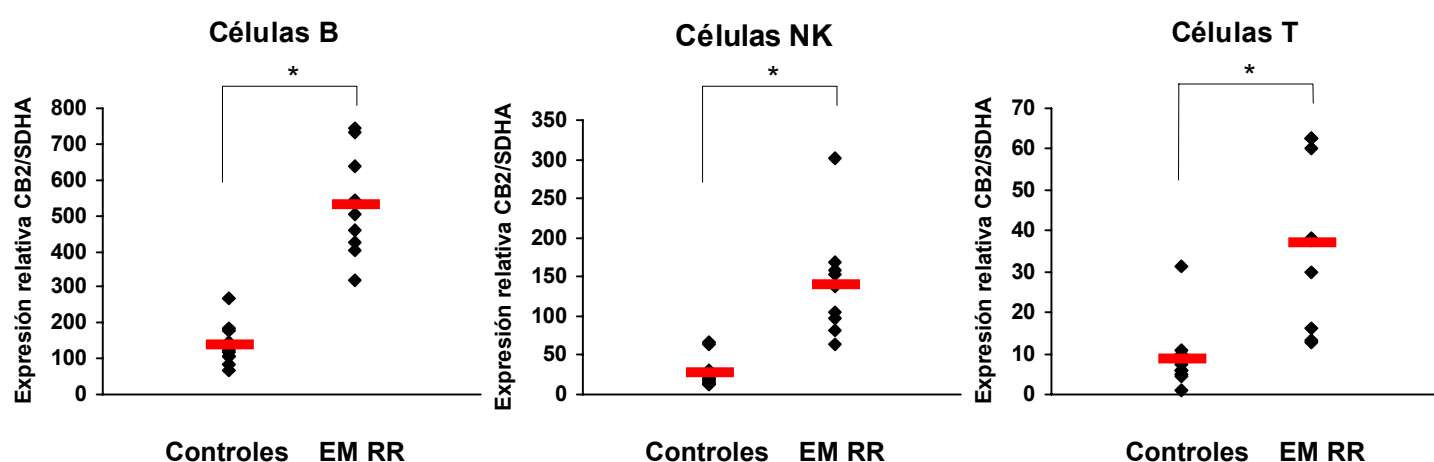
La **figura 32** representa los niveles de expresión del receptor  $CB_2$  (cada punto representa un individuo), en células **B**, **NK** y **T**, en controles y pacientes EM RR, respectivamente. Como se puede apreciar en los gráficos, los niveles del ARNm de  $CB_2$  en las células **B** son mayores que en las **NK** y éstos a su vez mayores que en las células **T**, hecho ya referido en la literatura (Galiegue et al. 1995).



**Figura 32.** Niveles de expresión del receptor  $CB_2$ , en células **B**, **NK** y **T**, en **controles** (n=11) y **pacientes EM RR** (n=9).

## 9.2. Diferencias en la tasa de expresión génica de CB<sub>2</sub> en células B, NK y T entre controles y pacientes EM RR

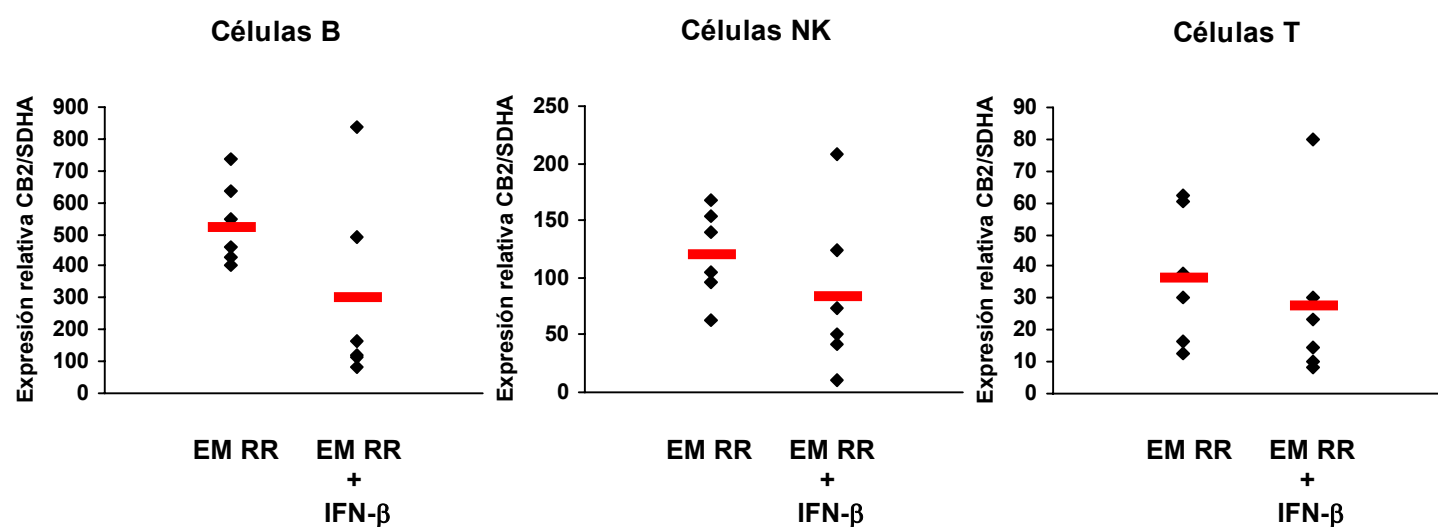
La **figura 33** representa los diferentes niveles de ARNm del receptor CB<sub>2</sub> entre controles y pacientes EM RR en células B, NK y T respectivamente. Se aplicó la prueba estadística Kruskal-Wallis y se encontraron diferencias significativas entre los grupos comparados: \* $p < 0.001$  para las células B, \* $p < 0.001$  para las células NK y \* $p = 0.001$  para las células T. Hubo un aumento significativo de la expresión de CB<sub>2</sub> en el grupo de pacientes EM RR.



**Figura 33.** Niveles de expresión de CB<sub>2</sub> entre **controles** (n=11) y pacientes **EM RR** (n=9) en células **B**, **NK** y **T**. La prueba estadística Kruskal-Wallis encuentra diferencias significativas entre los grupos comparados: \* $p < 0.001$  para las células B, \* $p < 0.001$  para las células NK y \* $p = 0.001$  para las células T. Se encuentra un aumento significativo de la expresión de CB<sub>2</sub> en el grupo de pacientes EM RR.

## 9.3. Estudio de las modificaciones de la expresión génica de CB<sub>2</sub> en pacientes con EMRR activa a los 6 meses de tratamiento con IFN- $\beta$

Las diferencias en la tasa de expresión de CB<sub>2</sub> en células B, NK y T entre los pacientes EM RR y una muestra tomada tras 6 meses de tratamiento con IFN- $\beta$ , se detalla en la **figura 34**. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos comparados, si bien se observó una cierta tendencia a la disminución, al compararlas con los pacientes antes de tomar el tratamiento, en las muestras de los pacientes tratados con interferón-beta.



**Figura 34.** Niveles de expresión de CB2, entre pacientes **EM RR** (n=6) y su tratamiento con interferón-beta (**EM RR + IFN-β**), en células **B**, **NK** y **T**. La prueba estadística Wilcoxon no encuentra diferencias significativas entre los grupos comparados.



## V. DISCUSIÓN

### 1. Cannabinoides y EM

Los derivados de la planta *Cannabis sativa* se encuentran entre las terapias no convencionales más usadas en EM. Hay una gran cantidad de datos, basados en experiencias de pacientes con EM que han utilizado productos de la planta del cannabis para aliviar algunos de los síntomas de la enfermedad como la espasticidad, el temblor y la ataxia entre otros (Pertwee 2002).

Se ha estudiado de forma controlada, por medio de ensayos clínicos, estos efectos beneficiosos del cannabis, no sólo en la EM sino también en otras enfermedades como Parkinson (Lastres-Becker et al. 2005), Alzheimer (Ramirez et al. 2005) y Huntington (Glass et al. 2004), en las que el cannabis puede tener un efecto no sólo paliativo sino neuroprotector (Pryce & Baker 2005). En EM existe un interés creciente por el papel de estos compuestos como posibles agentes moduladores de la respuesta inmunológica contra el SNC y como cooperadores en la protección neuroaxonal en estados crónicos de la enfermedad (Pryce & Baker 2005).

### 2. Cannabinoides y EAE

En los últimos 15 años numerosos trabajos demuestran la eficacia de diversos cannabinoides en distintos modelos de inflamación y desmielinización autoinmune:  $\Delta^9$ -THC en EAE (Fujiwara & Egashira 2004; Lyman et al. 1989),  $\Delta^8$ -THC en EAE (Wirguin et al. 1994), WIN-2, ACAE y JWH-015 en la TMEV (Arevalo-Martin et al. 2003; Croxford & Miller 2003), JWH-133, WIN-2 y  $\Delta^9$ -THC en la CREAE (Baker et al. 2000) y WIN-2 en la EAE inducida de forma activa (Ni et al. 2004).

En este estudio hemos empleado el modelo de EAE activa y pasiva aguda monofásica en ratas Lewis. Este modelo experimental ha sido ampliamente utilizado como prototipo de la enfermedad humana EM debido a su sencillez técnica y su reproducibilidad. Estas características hacen además que sea uno de los más empleados en trabajos que se relacionan con la terapéutica de la EAE.

La enfermedad obtenida en nuestro laboratorio al inmunizar ratas Lewis con médula de cobaya es muy homogénea, con un patrón que cursa con pérdida acusada de peso, disminución progresiva del tono de la cola (grados 1 y 2), paraparesia (grado 3) y paraplejia (grado 4) que puede progresar a muerte del animal (grado 5) en un pequeño porcentaje de los casos (5%), siendo lo habitual que los animales se recuperen por completo a partir de los días 20 a 22 después de la inoculación activa y a partir de los días 15 a 17 tras la transferencia

pasiva. En este trabajo demostramos por primera vez cómo WIN-2, un cannabinoide sintético, es una sustancia eficaz en el tratamiento de la EAE en su forma pasiva disminuyendo los signos clínicos y reduciendo la infiltración celular en la médula espinal de los animales tratados. Estos resultados se correlacionaban con la inducción de apoptosis en células encefalitógenas, células capaces de producir la forma pasiva de la EAE. Todo ello sugiere que la capacidad proapoptótica de WIN-2 puede ser uno de los posibles mecanismos de su efecto terapéutico en la EAE pasiva y está en consonancia con trabajos previos que demuestran que los cannabinoides pueden inducir apoptosis en células mononucleares activadas ([McKallip et al. 2002](#); [Bidinger et al. 2003](#)).

### 3. Expresión del receptor CB<sub>1</sub> en la EAE

Los estudios sobre el receptor CB<sub>1</sub> en los animales EAE mostraron una disminución del número de receptores CB<sub>1</sub> pero con una mayor actividad en zonas como el caudado-putamen y la corteza cerebral. La ausencia de cambios en zonas como el hipocampo y las estructuras límbicas son fácilmente explicables ya que son zonas no implicadas en el control motor; sin embargo es más difícil interpretar la falta de cambios en el cerebelo. En este contexto, hay que recordar que la ataxia, síntoma frecuente en pacientes con EM y causada por una pérdida de función en el cerebelo, es una manifestación que los cannabinoides reducen menos eficazmente ([Clifford 1983](#)).

Estos datos sugieren que el descenso de los receptores CB<sub>1</sub> en los ganglios basales, estructuras implicadas en el control del movimiento, podría explicar algunos de los signos motores característicos de la EAE. El hecho de que los receptores, aún disminuyendo su número, sean más activos, apoyarían los resultados en los que se observa cómo el uso de agonistas exógenos directos (derivados de la planta o sintéticos) ([Lyman et al. 1989](#); [Baker et al. 2000](#); [Sanchez et al. 2006](#)) o indirectos (inhibidores de recaptación o de la hidrólisis) ([Baker et al. 2001](#)) son útiles en el tratamiento sintomático de la EAE. Por el momento, no se puede decir que estos cambios estén implicados en su patogenia, sino que ocurren en paralelo y probablemente como una respuesta compensatoria a la afectación motora de la EAE. Esta teoría de la respuesta compensatoria podría tener apoyo en la experiencia de nuestro laboratorio al tratar animales EAE con rolipram, un inhibidor de la fosfodiesterasa 4 que suprime los signos clínicos de EAE, disminuye la infiltración celular en el SNC, reduce la expresión de genes proinflamatorios, de la metaloproteinasa de matriz 9 en SNC y ganglios linfáticos y la activación del factor de transcripción NF-κB en el SNC ([Martinez et al. 1999](#); [Sanchez et al. 2005](#)). Los animales tratados con rolipram no sólo tenían menos signos clínicos sino que en ellos se normalizaba la expresión del receptor CB<sub>1</sub> en los ganglios basales, la cual se había visto reducida en animales EAE.

Continuando con los estudios de los cambios en el sistema cannabinoide en la EAE, en otra colaboración ([Cabranes et al. 2005](#)) con el grupo del Dr. Fernández-Ruiz y del Dr. di Marzo del Istituto di Chimica Biomolecolare del Consiglio Nazionale delle Ricerche de Nápoles en Italia, se encontró una disminución en los niveles de endocannabinoides AEA y 2-AG en el cerebro de los animales EAE con un patrón diferente. Los experimentos revelaron disminución de AEA en regiones relacionadas con el control motor como el estriado y el mesencéfalo y en otras regiones como el tronco encefálico, hipocampo y la corteza cerebral, mientras que no se observaron cambios en el cerebelo, diencefalo ni en el área límbica anterior. Respecto a 2-AG se encontró reducción, con un patrón distinto, en el mesencéfalo, diencefalo y área límbica anterior; pero sin cambios en otras regiones como cerebelo, hipocampo, estriado y corteza cerebral. Estos datos están en contraposición con los obtenidos por otro grupo en el modelo CREAE que encontró un aumento modesto en los niveles de endocannabinoides en el cerebro de estos animales ([Baker et al. 2001](#)). Es importante reseñar que estos modelos reflejan aspectos diferentes de la EM, siendo nuestro modelo más inflamatorio y agudo que neurodegenerativo y crónico. El metabolismo de los endocannabinoides que se ve alterado en la EAE podría ser compensado por la administración de cannabinoides exógenos o inhibidores de la activación de los endocannabinoides permitiendo la reducción de los déficits neurológicos y el restablecimiento del sistema motor.

Viendo la modificación del sistema cannabinoide, reducción de CB<sub>1</sub> y de los endocannabinoides en ciertas áreas, que se daba en los animales EAE y que podían indicar que el uso de un cannabinoide podría tener un efecto beneficioso; decidimos tratar a estos animales con el cannabinoide sintético WIN-2.

Con la dosis y forma de administración del tratamiento en la forma activa no encontramos diferencias significativas (Fig. 1 A), pero al repetir el tratamiento en la forma pasiva encontramos un interesante efecto supresor, el cual fue aumentando al incrementar secuencialmente la dosis de WIN-2 empleada. Así con el tratamiento obtuvimos una reducción significativa en los días 7 y 8 PT, reducción que aumentó entre los días 6 y 9 al aumentar la dosis y frecuencia con el tratamiento II (Fig. 1 B). Este incremento de dosis en el segundo tratamiento se realizó para evitar una posible desensibilización y/o pérdida de receptores de cannabinoides hecho muy frecuente en tratamientos prolongados con cannabinoides, tanto in vivo ([Childers 2006](#)) como en cultivos celulares ([Bouaboula et al. 1999](#)).

#### **4. WIN-2 en la EAE activa y pasiva**

Las diferencias encontradas en los tratamientos entre la EAE activa y pasiva sugieren una menor eficacia sobre la fase de inducción y un claro efecto supresor en la fase efectora. Mientras que la fase primera de inducción de la EAE activa se produce un reclutamiento

mantenido de células encefalitógenas por la exposición prolongada al antígeno, las cuales circulan a lo largo de días por la sangre y entran en el SNC, la fase efectora en la EAE pasiva depende solamente del número de células que se inyecta al animal por vía intravenosa. Es verosímil que el efecto inmunomodulador del cannabinoide utilizado tenga más capacidad de interferir con las propiedades efectoras de las células encefalitógenas inyectadas que con la inducción y reclutamiento sostenido de células en la periferia. Algunas de las acciones inmunomoduladoras descritas con los cannabinoides, como la inhibición o prevención del procesamiento y presentación de antígeno por los macrófagos (Chuchawankul et al. 2004), la inhibición de la producción de mediadores inflamatorios (Croxford & Yamamura 2005) y la disminución en la migración de células encefalitógenas al SNC (Ni et al. 2004), podrían ser las responsables de la regulación a la baja de la fase efectora de la EAE pasiva y por lo tanto explicar, en parte, el efecto supresor de WIN-2.

Además, el efecto de los cannabinoides puede estar relacionado con el estado de activación celular, ya que éste puede aumentar la expresión de receptores de cannabinoides como se ha demostrado en otras estirpes celulares (Noe et al. 2001). En la EAE de inducción pasiva las células transferidas a los animales ya están activadas y pueden ser más sensibles a los cannabinoides. Trabajos previos (Achiron et al. 2000) con HU-211, otro cannabinoide sintético, en la forma activa de la EAE demostraron una falta de efecto supresor en fases tempranas de la enfermedad, efecto que sí encontraron aumentando las dosis y la duración del tratamiento en la fase efectora.

## 5. Histología

Una de las características patológicas mejor estudiadas en la EAE es la infiltración de células inmunes en el SNC de los animales afectados. Microscópicamente, la mejoría en los signos clínicos de los animales EAE tratados con WIN-2, se correlacionó con la disminución de la infiltración celular en la médula espinal, hecho ya relacionado en trabajos precedentes en EAE con otros cannabinoides (Achiron et al. 2000; Lyman et al. 1989) y con WIN-2 en otros modelos como el de la TMEV (Arevalo-Martin et al. 2003).

Se han apuntado varios mecanismos que explicarían la menor entrada de células inflamatorias en el SNC por WIN-2. Entre estos mecanismos se encuentra la reducción de la capacidad encefalitogénica de los linfocitos T, la alteración del patrón de secreción de citocinas proinflamatorias y/o reguladoras, la inducción de apoptosis y la inhibición de la migración. Ni (Ni et al. 2004) demostró que WIN-2 inhibía la interacción leucocito/endotelio que se ven aumentadas en la EAE y que permiten el paso de los linfocitos a través de la BHE al SNC.

## 6. Apoptosis

La apoptosis desempeña un papel dual en la EAE: por una parte la apoptosis de oligodendrocitos y neuronas es un hecho patológico que puede producir déficit neurológico, y por otra parte la eliminación apoptótica de células inflamatorias como linfocitos T y macrófagos (Pender et al. 1992) se considera uno de los fenómenos clave en la recuperación espontánea de la enfermedad, ya que impide el reclutamiento y la activación de más células inflamatorias.

Más de un 50% de los linfocitos T infiltrados pueden ser destruidos sincrónicamente mediante este mecanismo (Schmied et al. 1993). En experimentos de transferencia pasiva de la EAE se ha podido observar que las primeras células en desaparecer pertenecen a la población de células T autorreactivas transferida originalmente. Posteriormente los mecanismos de apoptosis afectarían a las células infiltradas en la segunda oleada de inflamación (Bauer et al. 1998).

Teniendo en cuenta el efecto proapoptótico de los cannabinoides descrito en diferentes tipos celulares (Guzman et al. 2002), la inducción de apoptosis linfocitaria podría participar, junto a una posible acción inmunomoduladora, en el mecanismo de mejora terapéutica inducida por WIN-2. En el presente trabajo demostramos por primera vez que WIN-2 induce apoptosis en células encefalitógenas y que es un efecto dosis dependiente que en parte está mediado por el receptor de cannabinoides CB<sub>2</sub>. En consonancia con estos resultados un trabajo en el que se usan animales deficientes en los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> demuestra cómo las células T deficientes en CB<sub>2</sub> en el SNC durante la EAE, manifiestan menor nivel de apoptosis y un aumento en la tasa de proliferación con el consecuente empeoramiento del curso de la enfermedad (Maresz et al. 2007).

Otros trabajos demostraron el efecto pro-apoptótico de WIN-2 en diferentes tipos celulares (Ellert-Miklaszewska et al. 2005; Sarfaraz et al. 2006; Casanova et al. 2003). La inducción de apoptosis sobre células encefalitógenas con el uso del enantiómero inactivo WIN-3 y el efecto de los antagonistas selectivos de los receptores SR1 y SR2 muestran una implicación parcial de los receptores de cannabinoides y en particular del receptor CB<sub>2</sub>. Además, la menor inducción de apoptosis al usar WIN-3 y la restante fracción de muerte celular que se mantiene al coincubar WIN-2 con los antagonistas sugiere la existencia de un mecanismo adicional de citotoxicidad independiente del receptor CB<sub>2</sub> que puede implicar otras dianas no caracterizadas de los cannabinoides o un mecanismo independiente de receptor. En este sentido, recientemente, se ha propuesto un mecanismo alternativo para el efecto inmunosupresor de los cannabinoides que implica la modulación del transportador de nucleósido (Carrier et al. 2006).

## 7. Receptores vanilloides

Estudios recientes muestran que algunos de los efectos de los cannabinoides no están mediados ni por CB<sub>1</sub> ni por CB<sub>2</sub>, sino por otros receptores entre los que se incluyen los VR1 ([Howlett et al. 2002](#)). Hasta la fecha se pensaba que la expresión de estos tipos de receptores estaba restringida a neuronas sensoriales aferentes y a ciertas áreas del SNC. Un gran número de investigaciones recientes revelan que también hay expresión en diferentes tejidos como intestino, pulmón, riñón, bazo, estómago, corazón ([Szallasi et al. 2006](#)) y en diferentes células como neutrófilos ([Heiner et al. 2003](#)), miocitos, mastocitos ([Stokes et al. 2005](#)) y linfocitos ([Saunders et al. 2007](#)). Se ha demostrado que WIN-2 vía VR1 puede ejercer acciones como la relajación vascular dependiente de endotelio ([Dannert et al. 2006](#)). Por lo mencionado anteriormente, los VR1 pueden estar implicados en procesos que van desde la activación de células T hasta la apoptosis pasando por la proliferación celular y la migración ([Montell 2001](#)). Ya que los VR1 se expresan en linfocitos y que WIN-2 puede actuar por esta vía, se decidió estudiar la implicación de estos receptores en esa parte del efecto apoptótico que no podía antagonizar SR2. Los resultados demostraron que con CPZ, un antagonista de VR1, no se conseguía revertir la apoptosis inducida por WIN-2, lo que implicaba que estos receptores no mediaban los efectos del cannabinoide. Pero algunos estudios sugieren que existen receptores VR1 insensibles a capsazepina ([Liu et al. 1998](#)) y otros apuntan la existencia de un receptor de naturaleza vanilloide, sensible a capsazepina y a SR1, que sería activado tanto por capsaicina como por los cannabinoides WIN-2 y CP 55940 ([Pertwee 2003](#)). Muchos de los efectos de los principales endocannabinoides como el 2-AG y la AEA se realizan a través de los receptores cannabinoides, pero también se ha visto la implicación de los receptores vanilloides, como es el caso de la AEA considerada un agonista total de receptores vanilloides.

La potente inducción de apoptosis encontrada con AEA, ya descrita por otros autores en células del sistema inmune ([Schwarz et al. 1994](#)), tampoco fue revertida con CPZ. Esta observación está de acuerdo con otros trabajos en los que inducen apoptosis con AEA y no observan implicación ni de los receptores cannabinoides ni vanilloides ([Movsesyan et al. 2004](#)), si bien teorizan sobre otros posibles mecanismos independientes de receptor como los “lipid rafts” (“balsas lipídicas”) que son microdominios de membrana que contienen altas concentraciones de colesterol y de esfingolípidos ([Sarker & Maruyama 2003](#)).

Todos estos resultados indican que la apoptosis inducida por WIN-2 en los linfocitos es el resultado de la combinación de mecanismos dependientes del receptor CB<sub>2</sub>, pero también independientes de éste. El mecanismo de acción de WIN-2 sobre la muerte celular programada de células encefalitógenas puede implicar además el paso a través de la membrana por los ya mencionados “lipid rafts” o la mediación de un receptor aún sin caracterizar ([Begg et al. 2005](#)). Respecto a la existencia de otros posibles receptores de cannabinoides, recientemente se ha

considerado que el receptor GPR55 acoplado a proteína G pudiera ser uno de estos nuevos receptores (Baker et al. 2006).

## 8. Apoptosis y vías de señalización

En las células de los mamíferos existen dos vías de señalización principales cuya activación concluye en apoptosis: la vía extrínseca o de receptores de muerte (Shen & Pervaiz 2006) que se activa por la unión de ligandos a los receptores de muerte pertenecientes a la superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral (TNF); la otra, llamada vía intrínseca o mitocondrial (Green 2005) que se activa cuando la célula es privada de factores de supervivencia como citocinas y factores de crecimiento o es expuesta a toxinas, daño intracelular o señales de estrés.

Los experimentos dirigidos a identificar el mecanismo de acción de WIN-2 sobre la muerte celular de las células encefalitógenas estudiadas en el presente trabajo, revelaron la implicación de las caspasas 10 y 3, proteínas implicadas en vía extrínseca de la apoptosis, resultados en consonancia con trabajos previos en células T (Lombard et al. 2005). Por el contrario, Bax y Bcl-2, dos proteínas reguladas en la señalización intrínseca de la apoptosis, no se modificaban tras la incubación con WIN-2. Caspasa-12, una proteína activada por el estrés del retículo endoplásmico tras la entrada del calcio tampoco se veía alterada por la acción de WIN-2. Es importante reseñar que el aumento de calcio intracelular en linfocitos T se ha descrito con la utilización de varios ligandos cannabinoides, pero no con WIN-2 ni tampoco con JWH-133, un agonista más selectivo de CB<sub>2</sub> (Rao & Kaminski 2006). En otros tipos celulares se ha observado que WIN-2 aumenta el calcio intracelular únicamente a través del receptor CB<sub>1</sub> (Lauckner et al. 2005).

La imposibilidad de revertir con los inhibidores la activación de caspasas es un hecho ya descrito (Movsesyan et al. 2004) pero, si bien este autor demostró la implicación de las calpaínas, proteínas implicadas en muchos modelos de muerte celular (Harwood et al. 2005), en la inducción de apoptosis y activación de caspasas, en las células encefalitógenas no se encontró reversión del efecto apoptótico ni por el uso de inhibidores de caspasas ni de calpaínas. Futuras investigaciones ayudaran a detallar cual es la ruta por la cual WIN-2 activa estas caspasas en este tipo celular.

## 9. p38 MAPK

Las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) son proteínas serina-treonina quinasas, que forman parte de las cascadas de transducción de señales necesarias para la integración



de diferentes estímulos externos como factores de crecimiento, citocinas, estrés celular, etc., regulando con ello una gran cantidad de procesos.

Dentro de las MAPK se distinguen tres subgrupos fundamentalmente: quinasa regulada por señales extracelulares (extracellular signal-regulated kinase; ERK), la quinasa jun del extremo N-terminal (stress-activated protein kinase/c-Jun NH(2)-terminal protein kinase; JNK) y p38. ERK se fosforila en respuesta a factores de crecimiento (Boulton et al. 1991) y estrés oxidativo (Aikawa et al. 1997); tras su activación participa en un amplio espectro de actividades incluyendo supervivencia, proliferación, diferenciación y movimiento (Rubinfeld & Seger 2005). Por el contrario, JNK y p38 que son activadas en respuesta a citocinas inflamatorias (Johnson & Lapadat 2002) y toxicidad del glutamato (Kawasaki et al. 1997), regulan múltiples procesos que abarcan desde la parada de ciclo celular, o la respuesta inflamatoria, hasta la apoptosis (Ono & Han 2000).

Un gran número de estudios han demostrado la implicación de la activación de JNK y p38 durante la apoptosis en diferentes estirpes celulares (neuronas, células hematopoyéticas, etc...) (Nebreda & Porras 2000), pero otros trabajos muestran que aunque hay activación de estas rutas, no es un hecho determinante en la inducción de la apoptosis (MacFarlane et al. 2000). Los cannabinoides, tanto a través de las proteínas G, como de segundos mensajeros como ceramidas, pueden actuar también sobre la cascada de proteína-quinasas activadas por mitógenos (MAPK), activada por señales extracelulares o por estrés, y mediante este mecanismo controlar la supervivencia o muerte celular (Guzman et al. 2001). Las cascadas MAPK, especialmente p38, se sabe desempeñan un papel fundamental en la regulación de este tipo de respuestas, tanto en la inducción como en la supresión de apoptosis. El mecanismo por el cual los cannabinoides inducen muerte celular programada no está totalmente definido, pero es sabido que p38 puede estar acoplado a los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> (Gertsch et al. 2004; Gustafsson et al. 2006) y se ha demostrado su implicación en la apoptosis dependiente de CB<sub>2</sub> (Herrera et al. 2005) o independiente de receptores de cannabinoides y vanilloides (Sarker & Maruyama 2003), aunque hay trabajos en los que el efecto pro-apoptótico es independiente de la activación de p38 (Galve-Roperh et al. 2000; Do et al. 2004). Otras quinasas implicadas en esta decisión de muerte o supervivencia celular, tras el tratamiento con cannabinoides, son JNK por sus efectos pro-apoptóticos (Downer et al. 2003) y ERK que por el contrario está asociada a una señalización de supervivencia (Ellert-Miklaszewska et al. 2005).

En este trabajo WIN-2 indujo activación de p38 mientras que WIN-3 no fue capaz de afectar a esta proteína. La activación de p38 precedió en el tiempo a la de las caspasas 3 y 10, indicando cinéticas diferentes en la mediación de la apoptosis. La preincubación con dos inhibidores de p38, SB203580 y SKF86002, no previno la apoptosis inducida por WIN-2 ni por WIN-3, ni tampoco se observó una reversión en la activación de las caspasas 3 ni 10. Estos



resultados indicarían que no hay relación directa entre la activación de p38 y la muerte celular de estas células encefalitógenas.

La activación de p38 se ha visto que induce apoptosis disminuyendo la expresión de Bcl-2, una proteína antiapoptótica (Merritt et al. 2000), esta activación de p38 induce apoptosis en células T CD8+, pero no en las CD4+. Quizás, estas diferencias en la acción de p38 puedan depender de los diferentes estímulos usados y de las diferencias entre células naive y CD4+ activadas.

## 10. Citocinas intracelulares.

Las citocinas son proteínas solubles o unidas a membrana producidas durante la fase efectora inmune que permiten la señalización intercelular entre leucocitos y entre leucocitos y células del parénquima. Atendiendo a su actuación en la inflamación, las citocinas se dividen en dos grupos: proinflamatorias, que intervienen en la iniciación y progresión de los fenómenos inflamatorios como las IL-1  $\alpha/\beta$ , IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y LT; y reguladoras o antiinflamatorias que amortiguan y/o previenen la inflamación como IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$  (Paul & Seder 1994). Las células T encefalitógenas pertenecen al tipo de células Th1 caracterizadas por secretar IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  /LT (Segal 2003). Al comienzo de la EAE, la llegada de estos linfocitos Th1 al SNC, promueve una cascada de activación de células endoteliales, perivasculares y astrocitos que como consecuencia son capaces de secretar citocinas del tipo de IL-1 e IL-6 y/o expresar MHC de clase II.

En recientes estudios con roedores, los cannabinoides han demostrado eficacia antiinflamatoria al disminuir ciertas citocinas asociadas a un perfil Th1, como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), el TNF- $\alpha$  y varias interleucinas como IL-2 e IL-12 (Klein et al. 2000). Respecto a las citocinas anti-inflamatorias de un perfil Th2, como IL-4 e IL-10, los cannabinoides han resultado ser reguladores positivos (Zhu et al. 2000).

Si bien el estudio CAMS (Cannabinoids in Multiple Sclerosis) (Zajicek et al. 2003) no reveló diferencias significativas en la producción de citocinas de pacientes en EM tratados con  $\Delta^9$ -THC sintético (Marinol®) y extracto de la planta (Cannador®) respecto a placebo (Katona et al. 2005), en los modelos animales de EAE se ha demostrado que los cannabinoides atenúan la inmunidad celular y la actividad Th1, coincidiendo con la reducción de los signos de la enfermedad. El uso de ratones deficientes en el receptor CB<sub>2</sub> demostró cómo los linfocitos T de estos animales en la EAE exhibían un incremento en la producción de citocinas inflamatorias empeorando la progresión de la enfermedad (Maresz et al. 2007).

En el caso de la TEMV se ha observado que WIN-2 y JWH-015 mejoraban significativamente la progresión de la enfermedad reduciendo la producción de IFN- $\gamma$  (Croxford & Miller 2003), la activación de la microglía y suprimiendo el número de células T CD4+ que

infiltran el cerebro (Arevalo-Martin et al. 2003). En nuestro modelo, el tratamiento con WIN-2 se tradujo en una reducción de los signos clínicos de los animales, acompañado de una disminución de la infiltración celular en la médula espinal, una reducción, in vitro, de la producción intracelular de IFN- $\gamma$  y un discreto aumento de la IL-4 de las células encefalitógenas. Respecto a TNF- $\alpha$  no se encontró reducción en sus niveles, que *per se* ya eran elevados antes de la estimulación, en contraposición a otros autores que sí la hallaron al tratar con WIN-2 células mononucleares de sangre periférica previamente estimuladas (Germain et al. 2002). Los altos niveles de TNF- $\alpha$  podrían explicar la ineficacia de WIN-2 a estas dosis de reducir la producción de esta citocina.

Es importante reseñar el papel del TNF- $\alpha$  en el curso de la EAE, pero hay que tener presente que terapias anti TNF- $\alpha$  que suprimieron el modelo animal (Croxford et al. 2000), fracasaron rotundamente en humanos empeorando el curso de la EM e incluso facilitación la aparición *de novo* de enfermedad desmielinizante del SNC (van Oosten et al. 1996). Esto apoya la idea de que quizá el concepto clásico del papel perjudicial de las citocinas proinflamatorias parece una simplificación para explicar la patogenia de la EM. Es posible que la señalización a través de los receptores de cannabinoides expresados en células T y B, así como en las presentadoras de antígeno, suprima la producción de citocinas de perfil Th1 y aumente las de perfil Th2.

## 11. NF- $\kappa$ B

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B fue inicialmente descrito como un elemento regulador de la transcripción de las cadenas ligeras kappa de las inmunoglobulinas (Sen & Baltimore 1986b). Posteriormente se describieron consensos NF- $\kappa$ B en los promotores de múltiples genes celulares y virales (Sen & Baltimore 1986a). El factor de transcripción NF- $\kappa$ B está implicado en la regulación de la inflamación, de la inmunidad, de la muerte celular y de la supervivencia (Baeuerle & Henkel 1994). La activación de las proteínas NF- $\kappa$ B tiene un papel central en la inflamación a través de la regulación de genes que codifican citocinas proinflamatorias, moléculas de adhesión, quimiocinas, factores de crecimiento, y enzimas inducibles como la ciclooxygenasa 2 (COX2) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Hanada & Yoshimura 2002). Esta ruta de regulación es activada por estimulación extracelular como reconocimiento antigénico, estrés y citocinas inflamatorias, por determinados productos relacionados con la infección bacteriana o viral, intermediarios reactivos de oxígeno, radiaciones  $\gamma$  y luz ultravioleta o ésteres de forbol (Baldwin, Jr. 1996); (Hanada & Yoshimura 2002).

Habitualmente NF- $\kappa$ B se encuentra en forma inactiva en el citoplasma de la célula donde permanece unido a proteínas inhibitorias I $\kappa$ B. Diversos estímulos extracelulares inducen la

fosforilación de I $\kappa$ B permitiendo su degradación por el proteosoma y la liberación de NF- $\kappa$ B que se trasloca al núcleo donde se une específicamente al DNA (Baldwin, Jr. 1996).

Muchos genes relacionados con el sistema inmune contienen sitios de unión  $\kappa$ B en sus regiones promotoras y por lo tanto pueden ser activados por NF- $\kappa$ B. Estos incluyen genes que codifican moléculas coestimuladoras, moléculas MHC, citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-2), quimiocinas (IL-8, proteína inflamatoria de macrófago -1 $\alpha$ ), enzimas inflamatorias (sintasa inducible de óxido nítrico, fosfolipasa-A2) y moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) (Barnes 1997). Todos estos factores solos o en combinación orquestan la iniciación y/o la progresión de enfermedades autoinmunes como la EM y la EAE. NF- $\kappa$ B regula la expresión del receptor de células T y de las moléculas estimuladoras que se requieren para la activación de diferentes células T específicas de mielina; también regula la expresión de genes requeridos para la migración (quimiocinas, moléculas de adhesión), para la función efectora de células inflamatorias (citocinas, enzimas inflamatorias) y se ha descrito su funcionamiento como un factor de transcripción tanto anti-apoptótico como pro-apoptótico, dependiendo del tipo celular y de la naturaleza del estímulo (Barkett & Gilmore 1999).

En ratones EAE, deficientes en NF- $\kappa$ B, el número de células inflamatorias presentes está significativamente más elevado que en los controles, lo que sugiere la implicación fundamental de este factor de transcripción en la fase efectora de la EAE (Hilliard et al. 1999).

Respecto a la activación de NF- $\kappa$ B por los cannabinoides en la literatura hay datos controvertidos. Se ha demostrado activación de NF- $\kappa$ B por agonistas cannabinoides en una línea celular NK (Daaka et al. 1997), en células HL-60 transfectadas con el receptor CB<sub>2</sub> (Derocq et al. 2000) y en células PC-12 (Erlandsson et al. 2002). Por otra parte en timocitos activados el cannabinoil inhibe la activación de NF- $\kappa$ B (Herring et al. 2001) sugiriendo un papel inmunosupresor. La AEA induce inhibición dependiente de dosis en células Jurkat por un mecanismo independiente de CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>; también se ha visto que la AEA inhibe una de las quinasas que fosforila a I $\kappa$ B, disminuyendo su degradación y por tanto la activación de NF- $\kappa$ B. (Sancho et al. 2003). Con dexametabol y WIN-2 se demostró, en un cultivo de células primarias, inhibición de la actividad de este factor de transcripción y de la apoptosis, actividad que está implicada en modelos de enfermedades neurológicas neurodegenerativas causando daño en el SNC y muerte neuronal (Juttler et al. 2004).

La disminución por WIN-2 de la actividad transcripcional de células transfectadas con sitios de unión a  $\kappa$ B observada en estos experimentos está de acuerdo con lo publicado por otros autores. Estos resultados fueron dependientes de dosis e implicaban parcialmente al receptor CB<sub>2</sub>

## 12. Expresión del receptor CB<sub>2</sub>

La presencia de un sistema endocannabinoide en el tejido linfoide sugiere que los cannabinoides pueden ejercer un efecto en el sistema inmunológico. Como ya se ha mencionado, los niveles tanto del receptor canabinoide CB<sub>1</sub> como CB<sub>2</sub> están distribuidos, en orden decreciente, en las células del sistema inmune humanos de la siguiente forma: células B > células NK > monocitos > neutrófilos > leucocitos CD8+ > leucocitos CD4+ (Galiegue et al. 1995). Las células murinas muestran un patrón de distribución similar (Lee et al. 2001), sin embargo, la expresión de CB<sub>2</sub> en estas células, tanto en humanos como en ratas y ratones, es superior a la CB<sub>1</sub> (Schatz et al. 1997).

La producción de endocannabinoides se ha observado en macrófagos y leucocitos (Pestonjamasp & Burstein 1998); (Bisogno et al. 1997), esta producción y la presencia de receptores cannabinoides en estas células las convierte en posibles dianas terapéuticas para el tratamiento con cannabinoides de enfermedades inmunomediadas como la EM.

## 13. Variación de la expresión génica del receptor CB<sub>2</sub> en células del sistema inmunológico de pacientes de EM

Las células del sistema inmune frecuentemente expresan nuevos genes al ser estimuladas con antígenos u otras sustancias bioactivas. El nivel de expresión de CB<sub>2</sub> en las células del sistema inmunológico depende de cómo, dónde y qué active estas células.

Se ha descrito cómo disminuye la expresión de CB<sub>2</sub> en esplenocitos, macrófagos, microglía y células dendríticas en respuesta a estímulos como lipopolisacárido (LPS) (Matias et al. 2002); (Lee et al. 2001). Por otra parte también se ha observado aumento de la expresión tras estímulos inflamatorios (Carlisle et al. 2002), como podría ser el caso del ambiente inflamatorio característico de los pacientes de EM. Este incremento en la expresión del ARNm de CB<sub>2</sub> que encontramos en las células B, NK y T puede hacerlas más sensibles a las acciones mediadas por cannabinoides y por lo tanto restaurar un sistema que ha sido alterado por la situación inflamatoria. Esto podría ocurrir por diversos mecanismos quizá suprimiendo las células que son requeridas para la enfermedad, impidiendo el paso de estas células al SNC o cambiando el perfil inflamatorio entre otras acciones. Un trabajo reciente (Yiangou et al. 2006) demuestra un incremento de los niveles de CB<sub>2</sub> en regiones afectadas de las médulas espinales de enfermos de EM e indicaba una gran inmunoreactividad frente a CB<sub>2</sub> en células de microglía y macrófagos, las células efectoras más importantes del SNC. Otra investigación ha demostrado como CB<sub>2</sub> se expresa en linfocitos T, astrocitos y en microglía perivascular y reactiva en placas de EM, proponiendo esta expresión como un posible nuevo marcador para identificar placas activas en la enfermedad (Benito et al. 2007).

El incremento de la expresión del ARNm de CB<sub>2</sub> en las células B, NK y T de pacientes de EM que encontramos en este estudio sugiere que el sistema cannabinoide juega un importante papel en la respuesta inflamatoria en el SNC.

Diversos ensayos clínicos han demostrado que ambas formas químicas del IFN- $\beta$ , 1a y 1b, reducen la frecuencia e intensidad de las recaídas y a su vez retrasan la progresión de la discapacidad neurológica (Clerico et al. 2007; Buttmann & Rieckmann 2007). Si bien los mecanismos por los que el IFN- $\beta$  actúa en la EM no están completamente aclarados, este efecto terapéutico, presumiblemente podría estar mediado por una o más acciones inmunomoduladoras y antiinflamatorias, entre las que se incluyen algunas de las siguientes: inhibición de la secreción de gelatinasa y migración de células T, inhibición de la expresión de MHC de clase II IFN- $\gamma$  inducido, inhibición de la proliferación de células T y liberación de IFN- $\gamma$  y aumento de la expresión de IL-10 (Yong et al. 1998).

El estudio de la expresión génica de CB<sub>2</sub> en pacientes tras 6 meses de tratamiento con IFN- $\beta$  demostró una tendencia a la reducción de la expresión, sin ser significativa quizá debido al pequeño número de muestras analizadas hasta el momento. Esta tendencia a la disminución de la expresión de CB<sub>2</sub> puede interpretarse como una consecuencia de la reducción de la actividad proinflamatoria que el IFN- $\beta$  consigue en la periferia de los pacientes; si la menor expresión es un efecto directo de este medicamento y por tanto uno de sus mecanismos de acción, es una cuestión cuya respuesta requerirá la realización de estudios específicos.

#### 14. Cannabinoides y neuroprotección

Aparte de una fase inicial en la EM donde toma mayor importancia el componente inflamatorio, hay que tener en cuenta, en fases más tardías de la enfermedad, un componente neurodegenerativo con una importante acción de daño en los axones de las neuronas, lo que explica el incremento de la discapacidad y la pérdida de movilidad en los pacientes. Los cannabinoides también podrían ser eficaces en esta fase de neurodegeneración en la EM, al inhibir la liberación, en el SNC, de ciertos mediadores como radicales libres y glutamato que pueden estar implicados en el daño axonal. En el caso de la excitotoxicidad por glutamato (Nagayama et al. 1999), considerado un posible mediador del daño neuronal y oligodendrocítico en el SNC en la EM, los cannabinoides han demostrado ser neuroprotectores. Asimismo, en el modelo de CREAE, ratones deficientes en el receptor CB<sub>1</sub> sufren un aumento significativo del daño axonal (Pryce et al. 2003). Además, recientes trabajos hacen tomar mayor importancia a la expresión de CB<sub>2</sub> en el SNC (Van Sickle et al. 2005; Gong et al. 2006; Onaivi et al. 2006).

Los cannabinoides además del control sintomático en la EM, puede mejorar también los procesos inflamatorios y neurodegenerativos que al final conducen a una disfunción

neurológica irreversible en la EM. Los agonistas CB<sub>2</sub> puros, que además presentan menores efectos sedantes y psicoactivos o la manipulación de los cannabinoides endógenos con inhibidores de la recaptación y degradación, pueden constituir una nueva herramienta terapéutica, sola o concomitante con los medicamentos actuales para la EM.

## VI. CONCLUSIONES

1. El cannabinoide sintético WIN-2 a la dosis de tratamiento aplicada suprime los signos clínicos y la infiltración medular de la EAE pasiva y no los de la EAE activa.
2. WIN-2 y otros cannabinoides (AEA y 2-AG) inducen apoptosis en las células encefalitógenas, de forma dosis dependiente con cierta participación del receptor CB<sub>2</sub> y sin existir un efecto mediado por receptores vanilloides.
3. La inducción de apoptosis parece producirse por la ruta extrínseca debido a un aumento de las formas activas de caspasa 10 y 3, si bien la ausencia de efecto de ciertos inhibidores de caspasas y calpaínas implica la participación de otras vías aún no esclarecidas.
4. El papel que WIN-2 juega sobre la producción de citocinas proinflamatorias por células encefalitógenas es el de inhibidor de IFN- $\gamma$  y no parece tener efecto sobre TNF- $\alpha$ . Por otra parte, WIN-2 tiene un ligero efecto potenciador sobre la citocina IL-10 y que no se observa sobre la IL-4.
5. WIN-2 inhibe la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en parte a través del receptor CB<sub>2</sub> como se deduce de la acción de su antagonista específico SR144528.
6. La activación de p38 que se observa con WIN-2 no está relacionada con la inducción de apoptosis con este cannabinoide en las células encefalitógenas.
7. Los niveles del ARNm del receptor CB<sub>2</sub> en células B, NK y T está aumentada en los pacientes de EM RR respecto a individuos neurológicamente sanos.
8. Los niveles del ARNm de CB<sub>2</sub> en pacientes de EM RR tras 6 meses de tratamiento con IFN- $\beta$  muestra una tendencia a reducirse.

## VII. REFERENCIAS

- Achiron, A., Miron, S., Lavie, V., Margalit, R. & Biegon, A. 2000. Dexanabinol (HU-211) effect on experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the treatment of acute relapses of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **102**, 26-31.
- Aikawa, R., Komuro, I., Yamazaki, T., Zou, Y., Kudoh, S., Tanaka, M., Shiojima, I., Hiroi, Y. & Yazaki, Y. 1997. Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J. Clin. Invest* **100**, 1813-1821.
- Alt, C., Laschinger, M. & Engelhardt, B. 2002. Functional expression of the lymphoid chemokines CCL19 (ELC) and CCL 21 (SLC) at the blood-brain barrier suggests their involvement in G-protein-dependent lymphocyte recruitment into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* **32**, 2133-2144.
- Archelos, J.J., Trotter, J., Previtali, S., Weissbrich, B., Toyka, K.V. & Hartung, H.P. 1998. Isolation and characterization of an oligodendrocyte precursor-derived B-cell epitope in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **43**, 15-24.
- Arevalo-Martin, A., Vela, J.M., Molina-Holgado, E., Borrell, J. & Guaza, C. 2003. Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis. *J. Neurosci.* **23**, 2511-2516.
- Baeuerle, P.A. & Henkel, T. 1994. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 141-179.
- Baker, D., Pryce, G., Croxford, J.L., Brown, P., Pertwee, R.G., Huffman, J.W. & Layward, L. 2000. Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature* **404**, 84-87.
- Baker, D., Pryce, G., Croxford, J.L., Brown, P., Pertwee, R.G., Makriyannis, A., Khanolkar, A., Layward, L., Fezza, F., Bisogno, T. & Di, M., V 2001. Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model. *FASEB J.* **15**, 300-302.
- Baker, D., Pryce, G., Davies, W.L. & Hiley, C.R. 2006. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 1-4.
- Baldwin, A.S., Jr. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 649-683.
- Barann, M., Molderings, G., Bruss, M., Bonisch, H., Urban, B.W. & Gothert, M. 2002. Direct inhibition by cannabinoids of human 5-HT3A receptors: probable involvement of an allosteric modulatory site. *Br. J. Pharmacol.* **137**, 589-596.
- Barkett, M. & Gilmore, T.D. 1999. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**, 6910-6924.
- Barnes, M.P. 2006. Sativex: clinical efficacy and tolerability in the treatment of symptoms of multiple sclerosis and neuropathic pain. *Expert. Opin. Pharmacother.* **7**, 607-615.
- Barnes, P.J. 1997. Nuclear factor-kappa B. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 867-870.
- Bauer, J., Bradl, M., Hickley, W.F., Forss-Petter, S., Breitschopf, H., Linington, C., Wekerle, H. & Lassmann, H. 1998. T-cell apoptosis in inflammatory brain lesions: destruction of T cells does not depend on antigen recognition. *Am. J. Pathol.* **153**, 715-724.
- Bauer, J., Wekerle, H. & Lassmann, H. 1995. Apoptosis in brain-specific autoimmune disease. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 839-843.



- Begg,M., Pacher,P., Batkai,S., Osei-Hyiaman,D., Offertaler,L., Mo,F.M., Liu,J. & Kunos,G. 2005. Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol. Ther.* **106**, 133-145.
- Beltramo,M., Stella,N., Calignano,A., Lin,S.Y., Makriyannis,A. & Piomelli,D. 1997. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* **277**, 1094-1097.
- Ben Nun,A. 1991. Staphylococcal enterotoxin B as a potent suppressant of T cell proliferative responses in rats. *Eur. J. Immunol.* **21**, 815-818.
- Benito,C., Romero,J.P., Tolon,R.M., Clemente,D., Docagne,F., Hillard,C.J., Guaza,C. & Romero,J. 2007. Cannabinoid CB1 and CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are specific markers of plaque cell subtypes in human multiple sclerosis. *J. Neurosci.* **27**, 2396-2402.
- Berdyshev,E.V. 2000. Cannabinoid receptors and the regulation of immune response. *Chem. Phys. Lipids* **108**, 169-190.
- Berrendero,F., Sanchez,A., Cabranes,A., Puerta,C., Ramos,J.A., Garcia-Merino,A. & Fernandez-Ruiz,J. 2001. Changes in cannabinoid CB(1) receptors in striatal and cortical regions of rats with experimental allergic encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. *Synapse* **41**, 195-202.
- Bidinger,B., Torres,R., Rossetti,R.G., Brown,L., Beltre,R., Burstein,S., Lian,J.B., Stein,G.S. & Zurier,R.B. 2003. Ajulemic acid, a nonpsychoactive cannabinoid acid, induces apoptosis in human T lymphocytes. *Clin. Immunol.* **108**, 95-102.
- Bisogno,T., Maurelli,S., Melck,D., De Petrocellis,L. & Di,M., V 1997. Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 3315-3323.
- Bouaboula,M., Dussossoy,D. & Casellas,P. 1999. Regulation of peripheral cannabinoid receptor CB2 phosphorylation by the inverse agonist SR 144528. Implications for receptor biological responses. *J. Biol. Chem.* **274**, 20397-20405.
- Bouaboula,M., Poinot-Chazel,C., Marchand,J., Canat,X., Bourrie,B., Rinaldi-Carmona,M., Calandra,B., Le Fur,G. & Casellas,P. 1996. Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur. J. Biochem.* **237**, 704-711.
- Bouaboula,M., Rinaldi,M., Carayon,P., Carillon,C., Delpech,B., Shire,D., Le Fur,G. & Casellas,P. 1993. Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *Eur. J. Biochem.* **214**, 173-180.
- Boulton,T.G., Nye,S.H., Robbins,D.J., Ip,N.Y., Radziejewska,E., Morgenbesser,S.D., DePinho,R.A., Panayotatos,N., Cobb,M.H. & Yancopoulos,G.D. 1991. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**, 663-675.
- Brady,C.M., DasGupta,R., Dalton,C., Wiseman,O.J., Berkley,K.J. & Fowler,C.J. 2004. An open-label pilot study of cannabis-based extracts for bladder dysfunction in advanced multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **10**, 425-433.
- Buttmann,M. & Rieckmann,P. 2007. Interferon-beta1b in multiple sclerosis. *Expert. Rev. Neurother.* **7**, 227-239.
- Cabranes,A., Pryce,G., Baker,D. & Fernandez-Ruiz,J. 2006. Changes in CB1 receptors in motor-related brain structures of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis mice. *Brain Res.* **1107**, 199-205.
- Cabranes,A., Venderova,K., de Lago,E., Fezza,F., Sanchez,A., Mestre,L., Valenti,M., Garcia-Merino,A., Ramos,J.A., Di,M., V & Fernandez-Ruiz,J. 2005. Decreased endocannabinoid levels in the brain and beneficial effects of agents activating cannabinoid and/or vanilloid receptors in a rat model of multiple sclerosis. *Neurobiol. Dis.* **20**, 207-217.

- Carlisle,S.J., Marciano-Cabral,F., Staab,A., Ludwick,C. & Cabral,G.A. 2002. Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int. Immunopharmacol.* **2**, 69-82.
- Carrier,E.J., Auchampach,J.A. & Hillard,C.J. 2006. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 7895-7900.
- Casanova,M.L., Blazquez,C., Martinez-Palacio,J., Villanueva,C., Fernandez-Acenero,M.J., Huffman,J.W., Jorcano,J.L. & Guzman,M. 2003. Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *J. Clin. Invest* **111**, 43-50.
- Charcot ,J.M. 1875. Leçon sur les maladies du systeme nerveux.Tome I., pp. 258. Paris: Bourneville.
- Childers,S.R. 2006. Activation of G-proteins in brain by endogenous and exogenous cannabinoids. *AAPS. J.* **8**, E112-E117.
- Chong,M.S., Wolff,K., Wise,K., Tanton,C., Winstock,A. & Silber,E. 2006. Cannabis use in patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **12**, 646-651.
- Chuchawankul,S., Shima,M., Buckley,N.E., Hartmann,C.B. & McCoy,K.L. 2004. Role of cannabinoid receptors in inhibiting macrophage costimulatory activity. *Int. Immunopharmacol.* **4**, 265-278.
- Clerico,M., Contessa,G. & Durelli,L. 2007. Interferon-beta1a for the treatment of multiple sclerosis. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **7**, 535-542.
- Clifford,D.B. 1983. Tetrahydrocannabinol for tremor in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **13**, 669-671.
- Croxford,J.L. & Miller,S.D. 2003. Immunoregulation of a viral model of multiple sclerosis using the synthetic cannabinoid R+WIN55,212. *J. Clin. Invest* **111**, 1231-1240.
- Croxford,J.L., Triantaphyllopoulos,K.A., Neve,R.M., Feldmann,M., Chernajovsky,Y. & Baker,D. 2000. Gene therapy for chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis using cells expressing a novel soluble p75 dimeric TNF receptor. *J. Immunol.* **164**, 2776-2781.
- Croxford,J.L. & Yamamura,T. 2005. Cannabinoids and the immune system: potential for the treatment of inflammatory diseases? *J. Neuroimmunol.* **166**, 3-18.
- Daaka,Y., Zhu,W., Friedman,H. & Klein,T.W. 1997. Induction of interleukin-2 receptor alpha gene by delta9-tetrahydrocannabinol is mediated by nuclear factor kappaB and CB1 cannabinoid receptor. *DNA Cell Biol.* **16**, 301-309.
- Dannert,M.T., Alsasua,A., Herradon,E., Martin,M.I. & Lopez-Miranda,V. 2006. Vasorelaxant effect of Win 55,212-2 in rat aorta: New mechanisms involved. *Vascul. Pharmacol.*
- de Lago,E., Fernandez-Ruiz,J., Ortega-Gutierrez,S., Cabranes,A., Pryce,G., Baker,D., Lopez-Rodriguez,M. & Ramos,J.A. 2006. UCM707, an inhibitor of the anandamide uptake, behaves as a symptom control agent in models of Huntington's disease and multiple sclerosis, but fails to delay/arrest the progression of different motor-related disorders. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **16**, 7-18.
- Dell'Osso,L.F. 2000. Suppression of pendular nystagmus by smoking cannabis in a patient with multiple sclerosis. *Neurology* **54**, 2190-2191.
- Derocq,J.M., Jbilo,O., Bouaboula,M., Segui,M., Clere,C. & Casellas,P. 2000. Genomic and functional changes induced by the activation of the peripheral cannabinoid receptor CB2 in the promyelocytic cells HL-60. Possible involvement of the CB2 receptor in cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **275**, 15621-15628.
- Devane,W.A., Dysarz,F.A., III, Johnson,M.R., Melvin,L.S. & Howlett,A.C. 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* **34**, 605-613.

- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. & Mechoulam, R. 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**, 1946-1949.
- Di Marzo, V., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Brandi, I., Jefferson, R.G., Winckler, R.L., Davis, J.B., Dasse, O., Mahadevan, A., Razdan, R.K. & Martin, B.R. 2001. Highly selective CB(1) cannabinoid receptor ligands and novel CB(1)/VR(1) vanilloid receptor "hybrid" ligands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 444-451.
- Di Marzo, V., De Petrocellis, L., Bisogno, T. & Melck, D. 1999. Metabolism of anandamide and 2-arachidonoylglycerol: an historical overview and some recent developments. *Lipids* **34 Suppl**, S319-S325.
- Do, Y., McKallip, R.J., Nagarkatti, M. & Nagarkatti, P.S. 2004. Activation through cannabinoid receptors 1 and 2 on dendritic cells triggers NF-kappaB-dependent apoptosis: novel role for endogenous and exogenous cannabinoids in immunoregulation. *J. Immunol.* **173**, 2373-2382.
- Docagne, F., Muneton, V., Clemente, D., Ali, C., Loria, F., Correa, F., Hernangomez, M., Mestre, L., Vivien, D. & Guaza, C. 2007. Excitotoxicity in a chronic model of multiple sclerosis: Neuroprotective effects of cannabinoids through CB1 and CB2 receptor activation. *Mol. Cell Neurosci.*
- Dowling, P., Husar, W., Menonna, J., Donnenfeld, H., Cook, S. & Sidhu, M. 1997. Cell death and birth in multiple sclerosis brain. *J. Neurol. Sci.* **149**, 1-11.
- Downer, E.J., Fogarty, M.P. & Campbell, V.A. 2003. Tetrahydrocannabinol-induced neurotoxicity depends on CB1 receptor-mediated c-Jun N-terminal kinase activation in cultured cortical neurons. *Br. J. Pharmacol.* **140**, 547-557.
- Eberhardt, W., Huwiler, A., Beck, K.F., Walpen, S. & Pfeilschifter, J. 2000. Amplification of IL-1 beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF-kappa B and activating protein-1 and involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Immunol.* **165**, 5788-5797.
- EINSTEIN, E.R., ROBERTSON, D.M., DICAPRIO, J.M. & MOORE, W. 1962. The isolation from bovine spinal cord of a homogeneous protein with encephalitogenic activity. *J. Neurochem.* **9**, 353-361.
- Ellert-Miklaszewska, A., Kaminska, B. & Konarska, L. 2005. Cannabinoids down-regulate PI3K/Akt and Erk signalling pathways and activate proapoptotic function of Bad protein. *Cell Signal.* **17**, 25-37.
- Erlandsson, N., Baumann, B., Rossler, O.G., Kaufmann, K., Giehl, K.M., Wirth, T. & Thiel, G. 2002. Lack of correlation between NF-kappaB activation and induction of programmed cell death in PC12 pheochromocytoma cells treated with 6-hydroxydopamine or the cannabinoid receptor 1-agonist CP55,940. *Biochem. Pharmacol.* **64**, 487-495.
- Fox, P., Bain, P.G., Glickman, S., Carroll, C. & Zajicek, J. 2004. The effect of cannabis on tremor in patients with multiple sclerosis. *Neurology* **62**, 1105-1109.
- Freeman, R.M., Adekanmi, O., Waterfield, M.R., Waterfield, A.E., Wright, D. & Zajicek, J. 2006. The effect of cannabis on urge incontinence in patients with multiple sclerosis: a multicentre, randomised placebo-controlled trial (CAMS-LUTS). *Int. Urogynecol. J. Pelvic. Floor. Dysfunct.* **17**, 636-641.
- FREUND, J. 1951. The effect of paraffin oil and mycobacteria on antibody formation and sensitization; a review. *Am. J. Clin. Pathol.* **21**, 645-656.
- Fujinami, R.S. & Oldstone, M.B. 1985. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* **230**, 1043-1045.
- Fujiwara, M. & Egashira, N. 2004. New perspectives in the studies on endocannabinoid and cannabis: abnormal behaviors associate with CB1 cannabinoid receptor and development of therapeutic application. *J. Pharmacol. Sci.* **96**, 362-366.

- Galiegue,S., Mary,S., Marchand,J., Dussossoy,D., Carriere,D., Carayon,P., Bouaboula,M., Shire,D., Le Fur,G. & Casellas,P. 1995. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.* **232**, 54-61.
- Galve-Roperh,I., Sanchez,C., Cortes,M.L., del Pulgar,T.G., Izquierdo,M. & Guzman,M. 2000. Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat. Med.* **6**, 313-319.
- Germain,N., Boichot,E., Advenier,C., Berdyshev,E.V. & Lagente,V. 2002. Effect of the cannabinoid receptor ligand, WIN 55,212-2, on superoxide anion and TNF-alpha production by human mononuclear cells. *Int. Immunopharmacol.* **2**, 537-543.
- Gerritse,K., Laman,J.D., Noelle,R.J., Aruffo,A., Ledbetter,J.A., Boersma,W.J. & Claassen,E. 1996. CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 2499-2504.
- Gertsch,J., Schoop,R., Kuenzle,U. & Suter,A. 2004. Echinacea alkylamides modulate TNF-alpha gene expression via cannabinoid receptor CB2 and multiple signal transduction pathways. *FEBS Lett.* **577**, 563-569.
- Gifford,A.N., Bruneus,M., Lin,S., Goutopoulos,A., Makriyannis,A., Volkow,N.D. & Gatley,S.J. 1999. Potentiation of the action of anandamide on hippocampal slices by the fatty acid amide hydrolase inhibitor, palmitylsulphonyl fluoride (AM 374). *Eur. J. Pharmacol.* **383**, 9-14.
- Giuffrida,A., Rodriguez,d.F. & Piomelli,D. 2000. Quantification of bioactive acylethanolamides in rat plasma by electrospray mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **280**, 87-93.
- Glanzmann,E. 1927. Die Nervosen Komplikationen der Varizellen der Variola und Vakzine. *Schweiz. Med. Wochenschr.* **57**, 145-154.
- Glass,M., van Dellen,A., Blakemore,C., Hannan,A.J. & Faull,R.L. 2004. Delayed onset of Huntington's disease in mice in an enriched environment correlates with delayed loss of cannabinoid CB1 receptors. *Neuroscience* **123**, 207-212.
- Gomez,d.P., Velasco,G. & Guzman,M. 2000. The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem. J.* **347**, 369-373.
- Gomez,d.P., Velasco,G., Sanchez,C., Haro,A. & Guzman,M. 2002. De novo-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis. *Biochem. J.* **363**, 183-188.
- Gong,J.P., Onaivi,E.S., Ishiguro,H., Liu,Q.R., Tagliaferro,P.A., Brusco,A. & Uhl,G.R. 2006. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* **1071**, 10-23.
- Green,D.R. 2005. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* **121**, 671-674.
- Greenberg,H.S., Werness,S.A., Pugh,J.E., Andrus,R.O., Anderson,D.J. & Domino,E.F. 1994. Short-term effects of smoking marijuana on balance in patients with multiple sclerosis and normal volunteers. *Clin. Pharmacol. Ther.* **55**, 324-328.
- Gustafsson,K., Christensson,B., Sander,B. & Flygare,J. 2006. Cannabinoid receptor-mediated apoptosis induced by R(+)-methanandamide and Win55,212-2 is associated with ceramide accumulation and p38 activation in mantle cell lymphoma. *Mol. Pharmacol.* **70**, 1612-1620.
- Guzman,M., Sanchez,C. & Galve-Roperh,I. 2001. Control of the cell survival/death decision by cannabinoids. *J. Mol. Med.* **78**, 613-625.
- Guzman,M., Sanchez,C. & Galve-Roperh,I. 2002. Cannabinoids and cell fate. *Pharmacol. Ther.* **95**, 175-184.

- Hampson, A.J., Bornheim, L.M., Scanziani, M., Yost, C.S., Gray, A.T., Hansen, B.M., Leonoudakis, D.J. & Bickler, P.E. 1998. Dual effects of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission. *J. Neurochem.* **70**, 671-676.
- Hanada, T. & Yoshimura, A. 2002. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* **13**, 413-421.
- Harwood, S.M., Yaqoob, M.M. & Allen, D.A. 2005. Caspase and calpain function in cell death: bridging the gap between apoptosis and necrosis. *Ann. Clin. Biochem.* **42**, 415-431.
- Heiner, I., Eisfeld, J., Halaszovich, C.R., Wehage, E., Jungling, E., Zitt, C. & Luckhoff, A. 2003. Expression profile of the transient receptor potential (TRP) family in neutrophil granulocytes: evidence for currents through long TRP channel 2 induced by ADP-ribose and NAD. *Biochem. J.* **371**, 1045-1053.
- Herrera, B., Carracedo, A., Diez-Zaera, M., Guzman, M. & Velasco, G. 2005. p38 MAPK is involved in CB2 receptor-induced apoptosis of human leukaemia cells. *FEBS Lett.* **579**, 5084-5088.
- Herring, A.C., Faubert Kaplan, B.L. & Kaminski, N.E. 2001. Modulation of CREB and NF-kappaB signal transduction by cannabinalol in activated thymocytes. *Cell Signal.* **13**, 241-250.
- Hickey, W.F. 1991. Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol.* **1**, 97-105.
- Hillard, C.J., Edgemond, W.S., Jarrahian, A. & Campbell, W.B. 1997. Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J. Neurochem.* **69**, 631-638.
- Hillard, C.J., Manna, S., Greenberg, M.J., DiCamelli, R., Ross, R.A., Stevenson, L.A., Murphy, V., Pertwee, R.G. & Campbell, W.B. 1999. Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**, 1427-1433.
- Hilliard, B., Samoilova, E.B., Liu, T.S., Rostami, A. & Chen, Y. 1999. Experimental autoimmune encephalomyelitis in NF-kappa B-deficient mice: roles of NF-kappa B in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J. Immunol.* **163**, 2937-2943.
- Howlett, A.C. 1984. Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and nantradol compounds. *Life Sci.* **35**, 1803-1810.
- Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., Mechoulam, R. & Pertwee, R.G. 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* **54**, 161-202.
- Jackson, S.J., Pryce, G., Diemel, L.T., Cuzner, M.L. & Baker, D. 2005. Cannabinoid-receptor 1 null mice are susceptible to neurofilament damage and caspase 3 activation. *Neuroscience* **134**, 261-268.
- Jacobsson, S.O., Rongard, E., Stridh, M., Tiger, G. & Fowler, C.J. 2000. Serum-dependent effects of tamoxifen and cannabinoids upon C6 glioma cell viability. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 1807-1813.
- Johnson, G.L. & Lapadat, R. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**, 1911-1912.
- Juttler, E., Potrovita, I., Tarabin, V., Prinz, S., Dong-Si, T., Fink, G. & Schwaninger, M. 2004. The cannabinoid dexaminalol is an inhibitor of the nuclear factor-kappa B (NF-kappa B). *Neuropharmacology* **47**, 580-592.
- Katona, S., Kaminski, E., Sanders, H. & Zajicek, J. 2005. Cannabinoid influence on cytokine profile in multiple sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* **140**, 580-585.
- Kawasaki, H., Morooka, T., Shimohama, S., Kimura, J., Hirano, T., Gotoh, Y. & Nishida, E. 1997. Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 18518-18521.



- Khanolkar,A.D., Abadji,V., Lin,S., Hill,W.A., Taha,G., Abouzid,K., Meng,Z., Fan,P. & Makriyannis,A. 1996. Head group analogs of arachidonylethanolamide, the endogenous cannabinoid ligand. *J. Med. Chem.* **39**, 4515-4519.
- Killestein,J., Hoogervorst,E.L., Reif,M., Kalkers,N.F., van Loenen,A.C., Staats,P.G., Gorter,R.W., Uitdehaag,B.M. & Polman,C.H. 2002. Safety, tolerability, and efficacy of orally administered cannabinoids in MS. *Neurology* **58**, 1404-1407.
- Killestein,J. & Polman,C. 2004. The therapeutic value of cannabinoids in MS: real or imaginary? *Mult. Scler.* **10**, 339-340.
- Killestein,J. & Polman,C.H. 2005. Current trials in multiple sclerosis: established evidence and future hopes. *Curr. Opin. Neurol.* **18**, 253-260.
- Klein,T.W., Lane,B., Newton,C.A. & Friedman,H. 2000. The cannabinoid system and cytokine network. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **225**, 1-8.
- Kuster,J.E., Stevenson,J.I., Ward,S.J., D'Ambra,T.E. & Haycock,D.A. 1993. Aminoalkylindole binding in rat cerebellum: selective displacement by natural and synthetic cannabinoids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **264**, 1352-1363.
- Lassmann,H., Bruck,W. & Lucchinetti,C.F. 2007. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.* **17**, 210-218.
- Lastres-Becker,I., Molina-Holgado,F., Ramos,J.A., Mechoulam,R. & Fernandez-Ruiz,J. 2005. Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **19**, 96-107.
- Lauckner,J.E., Hille,B. & Mackie,K. 2005. The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 19144-19149.
- Lee,S.F., Newton,C., Widen,R., Friedman,H. & Klein,T.W. 2001. Differential expression of cannabinoid CB(2) receptor mRNA in mouse immune cell subpopulations and following B cell stimulation. *Eur. J. Pharmacol.* **423**, 235-241.
- Liu,L., Szallasi,A. & Simon,S.A. 1998. A non-pungent resiniferatoxin analogue, phorbol 12-phenylacetate 13 acetate 20-homovanillate, reveals vanilloid receptor subtypes on rat trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience* **84**, 569-581.
- Lombard,C., Nagarkatti,M. & Nagarkatti,P.S. 2005. Targeting cannabinoid receptors to treat leukemia: role of cross-talk between extrinsic and intrinsic pathways in Delta9-tetrahydrocannabinol (THC)-induced apoptosis of Jurkat cells. *Leuk. Res.* **29**, 915-922.
- Lyman,W.D., Sonett,J.R., Brosnan,C.F., Elkin,R. & Bornstein,M.B. 1989. Delta 9-tetrahydrocannabinol: a novel treatment for experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* **23**, 73-81.
- MacFarlane,M., Cohen,G.M. & Dickens,M. 2000. JNK (c-Jun N-terminal kinase) and p38 activation in receptor-mediated and chemically-induced apoptosis of T-cells: differential requirements for caspase activation. *Biochem. J.* **348 Pt 1**, 93-101.
- Mackie,K., Lai,Y., Westenbroek,R. & Mitchell,R. 1995. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J. Neurosci.* **15**, 6552-6561.
- Maresz,K., Carrier,E.J., Ponomarev,E.D., Hillard,C.J. & Dittel,B.N. 2005. Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J. Neurochem.* **95**, 437-445.
- Maresz,K., Pryce,G., Ponomarev,E.D., Marsicano,G., Croxford,J.L., Shriver,L.P., Ledent,C., Cheng,X., Carrier,E.J., Mann,M.K., Giovannoni,G., Pertwee,R.G., Yamamura,T., Buckley,N.E., Hillard,C.J., Lutz,B.,

- Baker,D. & Dittel,B.N. 2007. Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via the cannabinoid receptor CB1 on neurons and CB2 on autoreactive T cells. *Nat. Med.* **13**, 492-497.
- Martin,R., Utz,U., Coligan,J.E., Richert,J.R., Flerlage,M., Robinson,E., Stone,R., Biddison,W.E., McFarlin,D.E. & McFarland,H.F. 1992. Diversity in fine specificity and T cell receptor usage of the human CD4+ cytotoxic T cell response specific for the immunodominant myelin basic protein peptide 87-106. *J. Immunol.* **148**, 1359-1366.
- Martinez,I., Puerta,C., Redondo,C. & Garcia-Merino,A. 1999. Type IV phosphodiesterase inhibition in experimental allergic encephalomyelitis of Lewis rats: sequential gene expression analysis of cytokines, adhesion molecules and the inducible nitric oxide synthase. *J. Neurol. Sci.* **164**, 13-23.
- Matias,I., Pochard,P., Orlando,P., Salzet,M., Pestel,J. & Di,M., V 2002. Presence and regulation of the endocannabinoid system in human dendritic cells. *Eur. J. Biochem.* **269**, 3771-3778.
- Matsuda,M., Tsukada,N., Koh,C.S., Iwahashi,T., Shimada,K. & Yanagisawa,N. 1994. Expression of intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 in the spinal cord of rats during acute experimental allergic encephalomyelitis. *Autoimmunity* **19**, 15-22.
- McCombe,P.A., de Jersey,J. & Pender,M.P. 1994. Inflammatory cells, microglia and MHC class II antigen-positive cells in the spinal cord of Lewis rats with acute and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* **51**, 153-167.
- McDonald,W.I., Compston,A., Edan,G., Goodkin,D., Hartung,H.P., Lublin,F.D., McFarland,H.F., Paty,D.W., Polman,C.H., Reingold,S.C., Sandberg-Wollheim,M., Sibley,W., Thompson,A., van den,N.S., Weinshenker,B.Y. & Wolinsky,J.S. 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **50**, 121-127.
- McGeachy,M.J. & Anderton,S.M. 2005. Cytokines in the induction and resolution of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cytokine* **32**, 81-84.
- McKallip,R.J., Lombard,C., Martin,B.R., Nagarkatti,M. & Nagarkatti,P.S. 2002. Delta(9)-tetrahydrocannabinol-induced apoptosis in the thymus and spleen as a mechanism of immunosuppression in vitro and in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302**, 451-465.
- Mechoulam,R. & Gaoni,Y. 1967. The absolute configuration of delta-1-tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron Lett.* **12**, 1109-1111.
- Meinck,H.M., Schonle,P.W. & Conrad,B. 1989. Effect of cannabinoids on spasticity and ataxia in multiple sclerosis. *J. Neurol.* **236**, 120-122.
- Merritt,C., Enslin,H., Diehl,N., Conze,D., Davis,R.J. & Rincon,M. 2000. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in vivo selectively induces apoptosis of CD8(+) but not CD4(+) T cells. *Mol. Cell Biol.* **20**, 936-946.
- Molina-Holgado,E., Vela,J.M., Arevalo-Martin,A., Almazan,G., Molina-Holgado,F., Borrell,J. & Guaza,C. 2002. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J. Neurosci.* **22**, 9742-9753.
- Molina-Holgado,F., Rubio-Araiz,A., Garcia-Ovejero,D., Williams,R.J., Moore,J.D., Arevalo-Martin,A., Gomez-Torres,O. & Molina-Holgado,E. 2007. CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation. *Eur. J. Neurosci.* **25**, 629-634.
- Montell,C. 2001. Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE.* **2001**, RE1.
- Movsesyan,V.A., Stoica,B.A., Yakovlev,A.G., Knoblach,S.M., Lea,P.M., Cernak,I., Vink,R. & Faden,A.I. 2004. Anandamide-induced cell death in primary neuronal cultures: role of calpain and caspase pathways. *Cell Death. Differ.* **11**, 1121-1132.

- Munro,S., Thomas,K.L. & Abu-Shaar,M. 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365**, 61-65.
- Nagayama,T., Sinor,A.D., Simon,R.P., Chen,J., Graham,S.H., Jin,K. & Greenberg,D.A. 1999. Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J. Neurosci.* **19**, 2987-2995.
- Nebreda,A.R. & Porras,A. 2000. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 257-260.
- Ni,X., Geller,E.B., Eppihimer,M.J., Eisenstein,T.K., Adler,M.W. & Tuma,R.F. 2004. Win 55212-2, a cannabinoid receptor agonist, attenuates leukocyte/endothelial interactions in an experimental autoimmune encephalomyelitis model. *Mult. Scler.* **10**, 158-164.
- Noe,S.N., Newton,C., Widen,R., Friedman,H. & Klein,T.W. 2001. Modulation of CB1 mRNA upon activation of murine splenocytes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **493**, 215-221.
- Notcutt,W., Price,M., Miller,R., Newport,S., Phillips,C., Simmons,S. & Sansom,C. 2004. Initial experiences with medicinal extracts of cannabis for chronic pain: results from 34 'N of 1' studies. *Anaesthesia* **59**, 440-452.
- Onaivi,E.S., Ishiguro,H., Gong,J.P., Patel,S., Perchuk,A., Meozzi,P.A., Myers,L., Mora,Z., Tagliaferro,P., Gardner,E., Brusco,A., Akinshola,B.E., Liu,Q.R., Hope,B., Iwasaki,S., Arinami,T., Teasenfiz,L. & Uhl,G.R. 2006. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1074**, 514-536.
- Ono,K. & Han,J. 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal.* **12**, 1-13.
- Ortega-Gutierrez,S. 2005. Therapeutic perspectives of inhibitors of endocannabinoid degradation. *Curr. Drug Targets. CNS. Neurol. Disord.* **4**, 697-707.
- Ortega-Gutierrez,S., Molina-Holgado,E., Arevalo-Martin,A., Correa,F., Viso,A., Lopez-Rodriguez,M.L., Di,M., V & Guaza,C. 2005. Activation of the endocannabinoid system as therapeutic approach in a murine model of multiple sclerosis. *FASEB J.* **19**, 1338-1340.
- Pacheco,M., Childers,S.R., Arnold,R., Casiano,F. & Ward,S.J. 1991. Aminoalkylindoles: actions on specific G-protein-linked receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **257**, 170-183.
- Pahan,K. & Schmid,M. 2000. Activation of nuclear factor-kB in the spinal cord of experimental allergic encephalomyelitis. *Neurosci. Lett.* **287**, 17-20.
- Paterson,P.Y. 1960. Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *J. Exp. Med.* **111**, 119-136.
- Paul,W.E. & Seder,R.A. 1994. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* **76**, 241-251.
- Paxinos,G. & Watson,C. 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. London: Academic press. edn.
- Pender,M.P., McCombe,P.A., Yoong,G. & Nguyen,K.B. 1992. Apoptosis of alpha beta T lymphocytes in the nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis: its possible implications for recovery and acquired tolerance. *J. Autoimmun.* **5**, 401-410.
- Pender,M.P. & Rist,M.J. 2001. Apoptosis of inflammatory cells in immune control of the nervous system: role of glia. *Glia* **36**, 137-144.
- Pertwee,R.G. 1997. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol. Ther.* **74**, 129-180.



- Pertwee,R.G. 1998. Pharmacological, physiological and clinical implications of the discovery of cannabinoid receptors. *Biochem. Soc. Trans.* **26**, 267-272.
- Pertwee,R.G. 2002. Cannabinoids and multiple sclerosis. *Pharmacol. Ther.* **95**, 165-174.
- Pertwee,R.G. 2003. Pharmacology of cannabinoid receptors. *First european workshop on cannabinoid research. Madrid.* **P7**.
- Pestonjamas,V.K. & Burstein,S.H. 1998. Anandamide synthesis is induced by arachidonate mobilizing agonists in cells of the immune system. *Biochim. Biophys. Acta* **1394**, 249-260.
- Petro,D.J. & Ellenberger,C., Jr. 1981. Treatment of human spasticity with delta 9-tetrahydrocannabinol. *J. Clin. Pharmacol.* **21**, 413S-416S.
- Poser,C.M., Paty,D.W., Scheinberg,L., McDonald,W.I., Davis,F.A., Ebers,G.C., Johnson,K.P., Sibley,W.A., Silberberg,D.H. & Tourtellotte,W.W. 1983. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann. Neurol.* **13**, 227-231.
- Pryce,G., Ahmed,Z., Hankey,D.J., Jackson,S.J., Croxford,J.L., Pocock,J.M., Ledent,C., Petzold,A., Thompson,A.J., Giovannoni,G., Cuzner,M.L. & Baker,D. 2003. Cannabinoids inhibit neurodegeneration in models of multiple sclerosis. *Brain* **126**, 2191-2202.
- Pryce,G. & Baker,D. 2005. Emerging properties of cannabinoid medicines in management of multiple sclerosis. *Trends Neurosci.* **28**, 272-276.
- Pryce,G. & Baker,D. 2007. Control of Spasticity in a Multiple Sclerosis Model is mediated by CB(1), not CB(2), Cannabinoid Receptors. *Br. J. Pharmacol.*
- Pugh,G., Jr., Smith,P.B., Dombrowski,D.S. & Welch,S.P. 1996. The role of endogenous opioids in enhancing the antinociception produced by the combination of delta 9-tetrahydrocannabinol and morphine in the spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **279**, 608-616.
- Raine,C.S. 1994. The Dale E. McFarlin Memorial Lecture: the immunology of the multiple sclerosis lesion. *Ann. Neurol.* **36 Suppl**, S61-S72.
- Ramirez,B.G., Blazquez,C., Gomez,d.P., Guzman,M. & de Ceballos,M.L. 2005. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J. Neurosci.* **25**, 1904-1913.
- Rao,G.K. & Kaminski,N.E. 2006. Cannabinoid-mediated elevation of intracellular calcium: a structure-activity relationship. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **317**, 820-829.
- Remlinger,P. 1928. Les paralysies du traitement antirabique. *Ann. Inst. Pasteur.* **42 (Suppl. 71)**.
- Rinaldi-Carmona,M., Barth,F., Heaulme,M., Shire,D., Calandra,B., Congy,C., Martinez,S., Maruani,J., Neliat,G., Caput,D. & . 1994. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* **350**, 240-244.
- Rinaldi-Carmona,M., Barth,F., Millan,J., Derocq,J.M., Casellas,P., Congy,C., Oustric,D., Sarran,M., Bouaboula,M., Calandra,B., Portier,M., Shire,D., Breliere,J.C. & Le Fur,G.L. 1998. SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **284**, 644-650.
- Rivers,T.M., Sprunt,D.H. & Berry,G.P. 1933. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J. Exp. Med.* **58**, 39-53.
- Rog,D.J., Nurmikko,T.J., Friede,T. & Young,C.A. 2005. Randomized, controlled trial of cannabis-based medicine in central pain in multiple sclerosis. *Neurology* **65**, 812-819.
- Rosenberg,G.A. 2002. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* **39**, 279-291.

- Rott,O., Wekerle,H. & Fleischer,B. 1992. Protection from experimental allergic encephalomyelitis by application of a bacterial superantigen. *Int. Immunol.* **4**, 347-353.
- Rubinfeld,H. & Seger,R. 2005. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol. Biotechnol.* **31**, 151-174.
- Ryberg,E., Vu,H.K., Larsson,N., Groblewski,T., Hjorth,S., Elebring,T., Sjogren,S. & Greasley,P.J. 2005. Identification and characterisation of a novel splice variant of the human CB1 receptor. *FEBS Lett.* **579**, 259-264.
- Sanchez,A.J., Gonzalez-Perez,P., Galve-Roperh,I. & Garcia-Merino,A. 2006. R-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)-pyrrolo-[1,2,3-de]-1,4 -benzoxazin-6-yl]-1-naphtalenylmethanone (WIN-2) ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces encephalitogenic T cell apoptosis: Partial involvement of the CB(2) receptor. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1697-1706.
- Sanchez,A.J., Puerta,C., Ballester,S., Gonzalez,P., Arriaga,A. & Garcia-Merino,A. 2005. Rolipram impairs NF-kappaB activity and MMP-9 expression in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* **168**, 13-20.
- Sanchez,C., Galve-Roperh,I., Canova,C., Brachet,P. & Guzman,M. 1998. Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. *FEBS Lett.* **436**, 6-10.
- Sancho,R., Calzado,M.A., Di,M., V, Appendino,G. & Munoz,E. 2003. Anandamide inhibits nuclear factor-kappaB activation through a cannabinoid receptor-independent pathway. *Mol. Pharmacol.* **63**, 429-438.
- Sarfaraz,S., Afaq,F., Adhami,V.M., Malik,A. & Mukhtar,H. 2006. Cannabinoid receptor agonist induced apoptosis of human prostate cancer cells LNCaP proceeds through sustained activation of ERK1/2 leading to G1 cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.*
- Sarker,K.P. & Maruyama,I. 2003. Anandamide induces cell death independently of cannabinoid receptors or vanilloid receptor 1: possible involvement of lipid rafts. *Cell Mol. Life Sci.* **60**, 1200-1208.
- Saunders,C.I., Kunde,D.A., Crawford,A. & Geraghty,D.P. 2007. Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and 2 (TRPV2) in human peripheral blood. *Mol. Immunol.* **44**, 1429-1435.
- Schatz,A.R., Lee,M., Condie,R.B., Pulaski,J.T. & Kaminski,N.E. 1997. Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **142**, 278-287.
- Schmied,M., Breitschopf,H., Gold,R., Zischler,H., Rothe,G., Wekerle,H. & Lassmann,H. 1993. Apoptosis of T lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence for programmed cell death as a mechanism to control inflammation in the brain. *Am. J. Pathol.* **143**, 446-452.
- Schon,F., Hart,P.E., Hodgson,T.L., Pambakian,A.L., Ruprah,M., Williamson,E.M. & Kennard,C. 1999. Suppression of pendular nystagmus by smoking cannabis in a patient with multiple sclerosis. *Neurology* **53**, 2209-2210.
- Schwarz,H., Blanco,F.J. & Lotz,M. 1994. Anadamide, an endogenous cannabinoid receptor agonist inhibits lymphocyte proliferation and induces apoptosis. *J. Neuroimmunol.* **55**, 107-115.
- Segal,B.M. 2003. Experimental autoimmune encephalomyelitis: cytokines, effector T cells, and antigen-presenting cells in a prototypical Th1-mediated autoimmune disease. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **3**, 86-93.
- Sen,R. & Baltimore,D. 1986a. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**, 921-928.
- Sen,R. & Baltimore,D. 1986b. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **46**, 705-716.

- Shen,H.M. & Pervaiz,S. 2006. TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution. *FASEB J.* **20**, 1589-1598.
- Shire,D., Carillon,C., Kaghad,M., Calandra,B., Rinaldi-Carmona,M., Le Fur,G., Caput,D. & Ferrara,P. 1995. An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **270**, 3726-3731.
- Skaper,S.D., Buriani,A., Dal Toso,R., Petrelli,L., Romanello,S., Facci,L. & Leon,A. 1996. The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 3984-3989.
- Sriram,S. & Steiner,I. 2005. Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **58**, 939-945.
- Stefano,G.B., Esch,T., Cadet,P., Zhu,W., Mantione,K. & Benson,H. 2003. Endocannabinoids as autoregulatory signaling molecules: coupling to nitric oxide and a possible association with the relaxation response. *Med. Sci. Monit.* **9**, RA63-RA75.
- Steffen,B.J., Butcher,E.C. & Engelhardt,B. 1994. Evidence for involvement of ICAM-1 and VCAM-1 in lymphocyte interaction with endothelium in experimental autoimmune encephalomyelitis in the central nervous system in the SJL/J mouse. *Am. J. Pathol.* **145**, 189-201.
- Stokes,A.J., Wakano,C., Del Carmen,K.A., Koblan-Huberson,M. & Turner,H. 2005. Formation of a physiological complex between TRPV2 and RGA protein promotes cell surface expression of TRPV2. *J. Cell Biochem.* **94**, 669-683.
- Storch,M. & Lassmann,H. 1997. Pathology and pathogenesis of demyelinating diseases. *Curr. Opin. Neurol.* **10**, 186-192.
- Stuart,G. & Krikorian,K.S. 1928. The neuro-paralytic accidents of anti-rabies treatment. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **22**, 327-377.
- Sugiura,T., Kondo,S., Sukagawa,A., Nakane,S., Shinoda,A., Itoh,K., Yamashita,A. & Waku,K. 1995. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**, 89-97.
- Svensden,K.B., Jensen,T.S. & Bach,F.W. 2004. Does the cannabinoid dronabinol reduce central pain in multiple sclerosis? Randomised double blind placebo controlled crossover trial. *BMJ* **329**, 253.
- Szallasi,A. & Blumberg,P.M. 1999. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* **51**, 159-212.
- Szallasi,A., Cruz,F. & Geppetti,P. 2006. TRPV1: a therapeutic target for novel analgesic drugs? *Trends Mol. Med.* **12**, 545-554.
- Teitelbaum,D., Aharoni,R., Klinger,E., Kreitman,R., Raymond,E., Malley,A., Shofti,R., Sela,M. & Arnon,R. 2004. Oral glatiramer acetate in experimental autoimmune encephalomyelitis: clinical and immunological studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1029**, 239-249.
- Twitchell,W., Brown,S. & Mackie,K. 1997. Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* **78**, 43-50.
- Ungerleider,J.T., Andyrskiak,T., Fairbanks,L., Ellison,G.W. & Myers,L.W. 1987. Delta-9-THC in the treatment of spasticity associated with multiple sclerosis. *Adv. Alcohol Subst. Abuse* **7**, 39-50.
- van Oosten,B.W., Barkhof,F., Truyen,L., Boringa,J.B., Bertelsmann,F.W., von Blomberg,B.M., Woody,J.N., Hartung,H.P. & Polman,C.H. 1996. Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology* **47**, 1531-1534.

- Van Sickle,M.D., Duncan,M., Kingsley,P.J., Mouihate,A., Urbani,P., Mackie,K., Stella,N., Makriyannis,A., Piomelli,D., Davison,J.S., Marnett,L.J., Di,M., V, Pittman,Q.J., Patel,K.D. & Sharkey,K.A. 2005. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* **310**, 329-332.
- Vaney,C., Heinzel-Gutenbrunner,M., Jobin,P., Tschopp,F., Gattlen,B., Hagen,U., Schnelle,M. & Reif,M. 2004. Efficacy, safety and tolerability of an orally administered cannabis extract in the treatment of spasticity in patients with multiple sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Mult. Scler.* **10**, 417-424.
- Wade,D.T., Makela,P., Robson,P., House,H. & Bateman,C. 2004. Do cannabis-based medicinal extracts have general or specific effects on symptoms in multiple sclerosis? A double-blind, randomized, placebo-controlled study on 160 patients. *Mult. Scler.* **10**, 434-441.
- Wade,D.T., Makela,P.M., House,H., Bateman,C. & Robson,P. 2006. Long-term use of a cannabis-based medicine in the treatment of spasticity and other symptoms in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **12**, 639-645.
- Wade,D.T., Robson,P., House,H., Makela,P. & Aram,J. 2003. A preliminary controlled study to determine whether whole-plant cannabis extracts can improve intractable neurogenic symptoms. *Clin. Rehabil.* **17**, 21-29.
- Wartmann,M., Campbell,D., Subramanian,A., Burstein,S.H. & Davis,R.J. 1995. The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Lett.* **359**, 133-136.
- Watanabe,R., Wege,H. & ter,M., V 1983. Adoptive transfer of EAE-like lesions from rats with coronavirus-induced demyelinating encephalomyelitis. *Nature* **305**, 150-153.
- Wekerle,H. 1993. T-cell autoimmunity in the central nervous system. *Intervirology* **35**, 95-100.
- Wirguin,I., Mechoulam,R., Breuer,A., Schezen,E., Weidenfeld,J. & Brenner,T. 1994. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by cannabinoids. *Immunopharmacology* **28**, 209-214.
- Witting,A., Chen,L., Cudaback,E., Straiker,A., Walter,L., Rickman,B., Moller,T., Brosnan,C. & Stella,N. 2006. Experimental autoimmune encephalomyelitis disrupts endocannabinoid-mediated neuroprotection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 6362-6367.
- Yednock,T.A., Cannon,C., Fritz,L.C., Sanchez-Madrid,F., Steinman,L. & Karin,N. 1992. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* **356**, 63-66.
- Yiangou,Y., Facer,P., Durrenberger,P., Chessell,I.P., Naylor,A., Bountra,C., Banati,R.R. & Anand,P. 2006. COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC. Neurol.* **6**, 12.
- Yong,V.W., Chabot,S., Stuve,O. & Williams,G. 1998. Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action. *Neurology* **51**, 682-689.
- Zajicek,J., Fox,P., Sanders,H., Wright,D., Vickery,J., Nunn,A. & Thompson,A. 2003. Cannabinoids for treatment of spasticity and other symptoms related to multiple sclerosis (CAMS study): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **362**, 1517-1526.
- Zajicek,J.P., Sanders,H.P., Wright,D.E., Vickery,P.J., Ingram,W.M., Reilly,S.M., Nunn,A.J., Teare,L.J., Fox,P.J. & Thompson,A.J. 2005. Cannabinoids in multiple sclerosis (CAMS) study: safety and efficacy data for 12 months follow up. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **76**, 1664-1669.
- Zhu,L.X., Sharma,S., Stolina,M., Gardner,B., Roth,M.D., Tashkin,D.P. & Dubinett,S.M. 2000. Delta-9-tetrahydrocannabinol inhibits antitumor immunity by a CB2 receptor-mediated, cytokine-dependent pathway. *J. Immunol.* **165**, 373-380.

Zhu,W., Friedman,H. & Klein,T.W. 1998. Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in macrophages and lymphocytes: involvement of Bcl-2 and caspase-1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**, 1103-1109.

## VIII. APÉNDICES

### 1. Artículos publicados relacionados con la tesis

- R-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)-pyrrolo-[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphtalenylmethanone (WIN-2) ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces encephalitogenic T cell apoptosis: partial involvement of the CB(2) receptor.  
**Sanchez AJ**, Gonzalez-Perez P, Galve-Roperh I, Garcia-Merino A.  
 Biochem Pharmacol. 2006 Dec 15;72(12):1697-706.
- Decreased endocannabinoid levels in the brain and beneficial effects of agents activating cannabinoid and/or vanilloid receptors in a rat model of multiple sclerosis.  
 Cabranes A, Venderova K, de Lago E, Fezza F, **Sanchez A**, Mestre L, Valenti M, Garcia-Merino A, Ramos JA, Di Marzo V, Fernandez-Ruiz J.  
 Neurobiol Dis. 2005 Nov;20(2):207-17.
- Changes in cannabinoid CB(1) receptors in striatal and cortical regions of rats with experimental allergic encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis.  
 Berrendero F, **Sanchez A**, Cabranes A, Puerta C, Ramos JA, Garcia-Merino A, Fernandez-Ruiz J.  
 Synapse. 2001 Sep 1;41(3):195-202.

## 2. Artículos publicados no relacionados con la tesis

- Rolipram impairs NF-kappaB activity and MMP-9 expression in experimental autoimmune encephalomyelitis.

**Sanchez AJ**, Puerta C, Ballester S, Gonzalez P, Arriaga A, Garcia-Merino A.

J Neuroimmunol. 2005 Nov;168(1-2):13-20.

- A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells.

Cuni S, Perez-Aciego P, Perez-Chacon G, Vargas JA, **Sanchez A**, Martin-Saavedra FM, Ballester S, Garcia-Marco J, Jorda J, Durantez A.

Leukemia. 2004 Aug;18(8):1391-400.